

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Studijní program: Biologie

Obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Michaela Klugerová

Molekulárně genetická analýza chromozomální oblasti 8q24 u pacientů s trichorhinofalangeálním syndromem nebo izolovanými exostózami

Molecular genetic analysis of chromosomal region 8q24 in patients with trichorhinophalangeal syndrome or isolated exostosis

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Roman Šolc

Konzultant: MUDr. Miloslav Kuklík, CSc.

Praha, 2015

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Romanu Šolcovi za odborné vedení této diplomové práce, za věnovaný čas a neocenitelnou pomoc při zpracovávání praktické části mé diplomové práce a dále za jeho cenné rady i připomínky. Svému konzultantovi MUDr. Miloslavu Kuklíkovi, CSc. za trpělivost, vstřícnost, ochotu a věnovaný čas při odborných konzultacích. RNDr. Štěpánce Hrdé a Mgr. Blance Hamplové, Ph.D. ze servisního pracoviště Laboratoře sekvenace DNA za pomoc při optimalizaci sekvenační reakce. Bc. Simoně Valterové za rady při vyhodnocování sekvenací. Dále RNDr. Pavlíně Čejkové, Ph.D., Mgr. Ivě Němečkové, Bc. Dominice Bencúrové a celému kolektivu Laboratoře molekulární antropologie za všestrannou pomoc při organizaci mé práce a poskytnuté zázemí. A v neposlední řadě patří velký dík mé rodině, která mě podporovala při studiu na této škole.

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením Mgr. Romana Šolce a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.“

V Praze,

Podpis

Abstrakt

Trichorhinofalangeální syndrom (TRPS) je malformační syndrom charakteristický kraniofaciálními a skeletálními abnormalitami s autozomálně dominantní dědičností. Dnes se na klinické i molekulární úrovni rozlišují tři typy – TRPS I, TRPS II a TRPS III, jejichž společným rysem jsou řídké vlasy, hruškovitý tvar nosu, dlouhé a ploché philtrum, úzký horní ret, odstávající uši, malá postava a kuželovité epifýzy článků prstů. Podtypy TRPS I a TRPS III jsou výsledkem mutací v genu *TRPS1*, který je zamapován do oblasti 8q24. Tento gen leží proximálně od genu *EXT1*; delece obou těchto genů zároveň vede k třetímu podtypu, TRPS II (Langer-Giedionův syndrom, LGS), jehož pacienti kromě obecných znaků TRPS trpí ještě mnohočetnými exostózami a někdy též mentální retardací.

V této diplomové práci byla provedena molekulárně genetická analýza na vzorku 16 pacientů, přičemž 8 probandů vykazovalo fenotyp TRPS a 8 probandů mělo pouze izolované exostózy. Z periferní žilní krve pacientů byla vyizolována DNA, která byla následně použita k vyšetření chromozomové oblasti 8q24 metodou MLPA („multiplex ligation-dependent probe amplification“). Tato analýza odhalila deleci u 1 pacienta s TRPS a u 1 pacienta s exostózami. Sekvenování kódujících exonů genu *TRPS1* u zbývajících 7 pacientů s TRPS odhalilo mutace u dalších 2 z nich. Celkově tedy byla odhalena pravděpodobná molekulární příčina onemocnění u 3 pacientů s TRPS a u 1 pacienta s exostózami.

Klíčová slova

Trichorhinofalangeální syndrom (TRPS), Langer-Giedionův syndrom (LGS), dědičné mnohočetné exostózy, gen *TRPS1*, gen *EXT1*, brychydaktylie, hypotrichóza, kuželovité epifýzy, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), mutační analýza

Abstract

Trichorhinophalangeal syndrome is a malformation syndrome characterized by craniofacial and skeletal abnormalities and is inherited in an autosomal dominant manner. We distinguish free subtypes on clinical and molecular level – TRPS I, TRPS II, TRPS III. All TRPS patients have sparse hair, a pear-shaped nose, a long flat philtrum, a thin upper lip and protruding ears. Skeletal abnormalities include cone-shaped epiphyses at the phalanges, hip malformations and short stature are present. The subgroups TRPS I and TRPS III are result of the mutated *TRPS1* gene, which is mapped into the 8q24 region. This gene is situated proximal of the *EXT1* gene, both genes are affected in a subgroup of patients with TRPS II. These patients suffer more from multiple (cartilaginous) exostoses and mental retardation. In this work we performed molecular genetic analysis of a sample of 16 patients, 8 probands showed a TRPS phenotype and 8 probands had only isolated exostoses. The peripheral venous blood of patients was used to gain purified DNA, which was subsequently used to investigate the chromosome 8q24 region using MLPA („multiplex ligation-dependent probe amplification”). This analysis revealed a deletion in 1 TRPS patient and 1 patient with exostoses. Sequencing of the *TRPS1* gene coding exons in remaining 7 TRPS patients revealed mutations in another 2 of them. Overall it was revealed probable molecular cause of the disease in 3 TRPS patients and 1 patient with exostosis.

Keywords

Trichorhinophalangeal syndrome (TRPS), Langer-Giedion syndrome (LGS), hereditary multiple exostosis, *TRPS1* gene, *EXT1* gene, brachydactyly, hypotrichosis, cone-shaped epiphyses, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), mutation analysis

Obsah

1. Literární rešerše.....	7
1.1 Trichorhinofalangeální syndrom.....	7
1.1.1 Historie.....	8
1.1.2 Podtyp I.....	8
1.1.3 Podtyp II.....	10
1.1.4 Podtyp III.....	12
1.1.5 Porovnání podtypů TRPS.....	14
1.1.6 Diagnostika.....	15
1.2 Gen <i>TRPS1</i>	16
1.2.1 Lokalizace.....	16
1.2.2 Struktura.....	17
1.2.3 Exprese.....	17
1.2.4 Mutace.....	19
1.2.5 Role genu <i>TRPS1</i> u jiných syndromů a chorob.....	22
1.3 Protein TRPS1.....	24
1.3.1 Lokalizace.....	25
1.3.2 Struktura.....	25
1.3.3 Funkce.....	27
1.3.4 Interakce s DNA a jinými molekulami.....	29
1.4 Dědičné mnohočetné exostózy.....	33
1.5 Gen <i>EXT1</i>	36
1.5.1 Lokalizace.....	36
1.5.2 Struktura.....	36
1.5.3 Exprese.....	37
1.5.4 Funkce.....	37
1.5.5 Mutace.....	38
2. Předpoklady a cíle diplomové práce.....	40
3. Materiál.....	41
4. Metody.....	42
4.1 Izolace DNA.....	42
4.1.1 Charakteristika metody.....	42
4.1.2 Pracovní protokol.....	42
4.2 MLPA.....	43
4.2.1 Charakteristika metody.....	43
4.2.2 Pracovní protokol.....	49
4.3 Mutační analýza.....	52
4.3.1 Charakteristika metody.....	52
4.3.2 Amplifikace exonů genu <i>TRPS1</i> metodou klasické PCR.....	53
4.3.3 Elektroforéza.....	55
4.3.4 Přečištění amplifikátů.....	57

4.3.5	Sekvenační reakce metodou asymetrické PCR s použitím ddNTPs.....	58
4.3.6	Přečištění ethanolem po sekvenační reakci.....	59
5.	Vyhodnocování získaných dat.....	60
5.1	Data získaná metodou MLPA.....	60
5.2	Data získaná z mutační analýzy.....	61
6.	Výsledky.....	62
6.1	Trichorhinofalangeální syndrom.....	62
6.1.1	Souhrnné výsledky.....	62
6.1.2	Charakteristika pacientů s pozitivním nálezem.....	63
6.1.2.1	Pacient č. 9.....	63
6.1.2.2	Pacient č. 12.....	65
6.1.2.3	Pacient č. 15.....	66
6.2	Exostózová choroba.....	68
6.2.1	Souhrnné výsledky.....	68
6.2.2	Charakteristika pacientů s pozitivním nálezem.....	68
6.2.2.1	Pacient č. 11.....	68
7.	Diskuze.....	70
8.	Závěr.....	74
9.	Seznam použitých zkratk.....	76
10.	Seznam použité literatury.....	77

1. Literární rešerše

1.1 Trichorhinofalangeální syndrom

Trichorhinofalangeální syndrom (trichorhinophalangeal syndrome; TRPS) je skupina vzácných genetických malformačních onemocnění s typickými kraniofaciálními a skeletálními abnormalitami, které lze dobře klinicky i radiologicky charakterizovat. Je způsoben mutací či kompletní delecí genu *TRPS1* (GeneID #7227) nalézajícího se na dlouhém raménku chromozomu 8 v oblasti 8q24.1. V současné době se rozlišují na klinické i molekulární úrovni tři typy označované jako TRPS I (Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] #190350), TRPS II (OMIM #150230) a TRPS III (OMIM #190351).

Nezávisle na typu syndromu jsou u všech pacientů popisovány charakteristické kraniofaciální znaky: jemné, řídké a pomalu rostoucí vlasy, mediálně silné avšak laterálně řidnoucí až chybějící obočí, hruškovitý či jinak baňatý tvar nosu, odstávající uši, dlouhé ploché philtrum a úzký horní ret. Méně často bývají popisovány i další klinické znaky, jako např. trojúhelníkovitý obličej, horizontální žlábek na bradě, mikrognácie, hypoplastická mandíbula, vysoce klenuté patro, nadpočetné zuby, vadný dentální skus (malokluze), změny nehtů. U některých pacientů jsou též nalézány další skeletální abnormality, ke kterým patří např. klinodaktylie, plochá chodidla, křídlovitá lopatka, skolióza, spontánní kostní fraktury (Michalek et al. 2009; Vaccaro et al. 2005) a u více než 70 % pacientů jsou přítomny i dysplasie kyčelního kloubu (např. zkrácení a zploštění femorálního krčku, coxa plana; zvětšení hlavice femuru, coxa magna; zmenšení úhlu mezi hlavicí a tělem stehenní kosti, coxa vara) (Machuca et al. 1997). U starších pacientů se tyto kyčelní abnormality mohou podobat degenerativní artróze (Ludecke et al. 2001). Nejtypičtějším radiografickým znakem TRPS jsou pak kuželovitě tvarované epifýzy („cone-shaped epiphyses“; CSEs), a to především na středních článcích prstů ruky, které však často nejsou viditelné před druhým rokem života. Na druhou stranu první náznak budoucích CSEs – mírná metafyzární konvexita – může být v některých případech detekována během prvního roku života (Giedion 1998 in Ludecke et al. 2001). Tato charakteristická kuželovitá deformita na středních článcích prstů je výsledkem předčasného nepravidelného uzavírání růstových plotének, což následně vede k růstové retardaci a abnormálním deformitám kostí ruky (spektrum mírné až těžké brachydaktylie z důvodu zkrácení metakarpálních kostí a článků prstů) (Giedion 1966 in Ludecke et al. 2001). Jedinci s TRPS bývají menšího vzrůstu; růstová retardace se u TRPS vyvíjí postnatálně a jedná se o progresivní (tedy s věkem se zhoršující) proces – to dokládá i skutečnost, že porodní délka novorozenců se pohybuje v mezích průměru (49-54 cm), a to i u jedinců, kteří se narodili postiženým rodičům. Kostní věk většinou zaostává oproti chronologickému věku až do období puberty, poté typicky akceleruje (Ludecke et al. 2001). Z důvodu markantní akcelerace během puberty se zkracuje adolescentní výškový spurt, čímž se ještě přispívá k finální malé postavě (Naselli et al. 1998).

Následně má každý typ ještě své další, charakteristické fenotypové znaky; nutno ovšem podotknout, že TRPS vykazuje široké klinické spektrum, co se týče stupně růstové retardace, brachydaktylie a rozvinutí dalších fenotypových znaků. Fenotyp se liší v závislosti

na věku a pohlaví, a to u pacientů nepříbuzných nesoucích identickou mutaci, u pacientů příbuzných, z jedné rodiny, (Ludecke et al. 2001) a dokonce i u monozygotních dvojčat (Naselli et al. 1998).

Dědičnost tohoto syndromu je autozomálně dominantní, ačkoliv více než polovina popsanych případů má sporadický původ (Ludecke et al. 2001). TRPS vykazuje velmi vysokou, ne-li kompletní, penetranci (tj. typické fenotypové znaky se projeví u všech jedinců nesoucího mutaci v daném genu). Zároveň však TRPS vykazuje i variabilní expresivitu (tj. stupeň projevu typického fenotypu je různý). Zdá se, že gen *TRPS1* je majoritním (ne-li jediným) lokusem, jehož mutace dá vzniknout TRPS (Ludecke et al. 2001).

1.1.1 Historie

Typické znaky trichorhinofalangeálního syndromu popsal již roku 1966 švýcarský radiolog Andreas Giedion. Ten si jako první všimnul spojitosti mezi pomalu rostoucími řídkými vlasy (tricho-), abnormálním tvarem nosu (-rhino-) a deformitami prstů (-phalangeal) (Giedion 1966 in Tsang et al. 2014). O tomto syndromu se tedy začalo hovořit jako o Giedionovu syndromu (později jako o trichorhinofalangeálním syndromu I, TRPS I). O tři roky déle, tedy v roce 1969, popsal Andreas Giedion a nezávisle na něm i americký radiolog Leonard O. Langer Jr. pacienta, který vykazoval právě tyto znaky, ale navíc trpěl mnohočetnými exostózami. V roce 1974 zavedl Hall. et al. pro tento fenotyp název Langer-Giedionův syndrom (LGS), či také TRPS II (Hall et al. 1974 in Tsang et al. 2014). Sugio a Kajii v roce 1984 a následně i Niikawa a Kamei v roce 1986 popsali pacienty s typickými faciálními znaky TRPS, bez mentální retardace, avšak s těžkou brachydaktylií a růstovou retardací. Žádný z těchto pacientů však neměl mnohočetné exostózy. Fenotyp těchto pacientů byl tedy zdánlivě podobný typu TRPS I, byl však mnohem závažnější a navíc byli pacienti výrazně malé postavy. Niikawa a Kamei pro fenotyp těchto pacientů navrhli označení TRPS III (Sugio-Kajii syndrom) (Niikawa and Kamei 1986). Dnes se tedy trichorhinofalangeální syndrom rozlišuje na tyto tři podtypy, které mají některé znaky shodné a jiné naopak charakteristické pro ten který podtyp.

Dlouho zůstávala molekulární podstata TRPS skryta. Teprve v roce 1995 se podařilo identifikování genu *EXT1* z chromozomé oblasti 8q24, a to u pacientů s Langer-Giedionovým syndromem (Ahn et al. 1995). Následně v roce 2000 odhalil Momeni et al. gen *TRPS1* v téže chromozomové oblasti a dokázal, že právě tento gen je u pacientů s TRPS deletován. Zároveň bylo potvrzeno, že u pacientů s TRPS II je výsledný fenotyp způsoben delecí obou genů zároveň, a tedy že TRPS II představuje typický syndrom přilehlých genů (Momeni et al. 2000).

1.1.2 Trichorhinofalangeální syndrom, typ I

Podtyp TRPS I představuje nejčastější a zároveň nejmírnější formu TRPS. Charakteristickými znaky jsou obecné znaky TRPS, tedy krátké, řídké, jemné, pomalu rostoucí vlasy, hruškovitý tvar nosu, dlouhý philtrum, laterálně řídnoucí obočí (Obr. 1), kuželovitě tvarované epifýzy především středních článků prstů rukou i nohou (Obr. 2), mírně zkrácené metakarpální a metatarsální kosti, brachydaktylie (převážně způsobena brachymesofalangii),

mírná postnatální růstová retardace a zpožděný kostní věk (Giedion 1998 in Ludecke et al. 2001). Méně často je popisováno též vybočení prstů v proximálních interfalangeálních kloubech (Corsini et al. 2014) a malé a nepravidelně tvarované femorální epifýzy (Vaccaro et al. 2005). Někdy je u pacientů nalézána brachydaktylie pouze u palců na ruce a na nohou; Ning et al. považuje právě izolovanou brachydaktylii palců u nohou jako specifický znak a tedy potenciální možnost jak syndrom klinicky rozpoznat (Ning et al. 2001). Dále byly u některých pacientů zjištěny problémy s vývinem druhé dentice a opožděný zubní věk (Machuca et al. 1997).



Obr. 1: Rodina s fenotypem TRPS I – typické znaky pozorujeme především u probanda (označen šipkou): dlouhé ploché philtrum, hruškovitý tvar nosu, velké odstávající uši, řídké vlasy s vysokou vlasovou hranicí ve frontální oblasti. Většina těchto znaků je pozorovatelná i u jeho matky (vlevo) a babičky z matčiny strany (vpravo), což demonstruje autozomálně dominantní dědičnost (Momeni et al. 2000).



Obr. 2: Radiologický snímek pravé ruky: kuželovitě tvarované epifýzy u středních článků prstů, ulnární vybočení 4. a 5. prstu, zkrácení 4. metakarpu (brachymetacarpalia) (Vaccaro et al. 2005).

Příčinou TRPS I na molekulární úrovni je mikrolece či bodová mutace v genu *TRPS1* (pokud je to bodová *missense* mutace, pak musí být tato mimo GATA zř doménu – viz kap. 1.1.4) nacházejícím se na dlouhém raménku chromozomu 8 (Ludecke et al. 2001). Pacienti s TRPS I mající mikrolece či bodovou mutaci v genu *TRPS1* vykazují většinou normální inteligenci (Ludecke et al. 2001; Ludecke et al. 1999; Ning et al. 2001; Sasaki et al. 1997). Byly však popsány dva případy pacientů s mentální retardací, kteří však měli rozsáhlejší, cytogenetickým pruhováním viditelnou, delecí v úseku 8q24 (Yamamoto et al. 1988 in Ludecke et al. 2001).

Giedion et al. (1973) původně navrhl autozomálně recesivní typ dědičnosti TRPS I, neboť popsal dva sourozence s TRPS I, kteří se narodili zdravým rodičům. V roce 2014 publikovala skupina Corsini et al. (2014) případ chlapce vykazujícího fenotyp TRPS I, u kterého byla potvrzena heterozygotní mutace v tomto genu. Shodnou mutaci našli i u jeho zdravé, fenotyp nevykazující, matky, překvapivě však ve formě 10% somatické mozaiky (Corsini et al. 2014). Somatická mutace v mozaice byla popsána i u mnoha jiných autozomálně dominantních či X-vázaných chorob a mohla by vysvětlit opakování choroby u sourozenců narozených zdravým rodičům (Erickson 2010 in Corsini et al. 2014). Podle Corsini et al. je právě germinální mozaicismus tím nejpravděpodobnějším vysvětlením pro opakování patologického fenotypu u sourozenců narozených zdravým rodičům a autozomálně recesivní typ dědičnosti je tak nepravděpodobný. Tato data vedla Corsiniho et al. k návrhu modifikace genetického poradenství pro TRPS I. Odhadují 5-10% riziko opakování TRPS I zdravým rodičům, kteří již mají jednoho postiženého potomka. Toto riziko skupina predikovala na základě již známého pozorovaného rizika opakování u jiných dominantně děděných chorob s prokazatelným germinálním mozaicismem, jako je např. osteogenesis imperfecta či neurofibromatosa typu 1 (Zlotogora 1998 in Corsini et al. 2014). Corsini et al. se domnívají, že toto opakování rizika by se mohlo dotýkat asi poloviny pacientů s TRPS I, u kterých se původně předpokládala mutace *de novo* (Corsini et al. 2014).

1.1.3 Trichorhinofalangeální syndrom, typ II

TRPS II či také Langer-Giedionův syndrom (LGS) je mikrolečnický syndrom postihující gen *TRPS1* a společně s ním i distálněji lokalizovaný gen *EXT1* (Exostosin 1); oba tyto geny jsou od sebe vzdáleny více než 1 Mb (Ludecke et al. 1995). Jedná se tedy o typický syndrom přilehlých genů způsobený heterozygotní intersticiální delecí v oblasti 8q24.1 (tj. výsledný fenotyp není výsledkem pleiotropního efektu mutací v jediném genu) (Ludecke et al. 1995); přičemž jako kritická pro vznik typického fenotypu se jeví podoblast 8q24.11-q24.13 nazývaná též „Langer-Giedion syndrome chromosomal region“ (LGCR) (Cook et al. 1993). Delece postihuje minimálně všechny geny od *TRPS1* až po *EXT1*¹ (Shanske et al. 2008), ale může být i rozsáhlejší (Hou et al. 1995): proximálně může zasahovat až do oblasti 8q22.2 a distálně až do oblasti 8q24.2 (Hilton et al. 2001; Ludecke et al. 1999). U větší části pacientů

¹ Všichni pacienti s TRPS II jsou tedy hemizygotní minimálně pro geny *EIF3S3*, *c8orf53*, *RAD21*, *LOC441376*, *SLC30A8* a *THRAP6*, které leží mezi *TRPS1* a *EXT1*. Zatím však žádná lidská autozomálně dominantní choroba nebyla asociována s některým z těchto šesti genů (Shanske et al. 2008).

bývá delece v této oblasti vizualizovatelná cytogenetickým pruhováním (Ludecke et al. 1991; Nardmann et al. 1997). Pokud je cytogenetickým pruhováním viditelná, pak varíruje ve své velikosti; od stěží rozpoznatelných asymetrií pruhů až po ztrátu signifikantních částí dlouhého raménka osmého chromozomu (Hou et al. 1995). Projevy této skeletální dysplázie v sobě spojují znaky dvou různých autozomálně dominantních syndromů; zahrnují obecné klinické symptomy TRPS, avšak navíc jsou přítomny ještě mnohočetné dědičné (chrupavčité či kostní) exostózy typu I plynoucí z mutace genu *EXT1* (Hereditary multiple exostoses, HME; OMIM 133700), a u většiny pacientů též mírná až střední mentální retardace (Hall et al. 1974 in Tsang et al. 2014). Exostózy jsou benigní, zpočátku chrupavčité, výrůstky, které jsou typicky přítomny v epifyzárních oblastech dlouhých kostí, a po uzávěru epifyzárních růstových chrupavek postupně enchondrálně osifikují v kostní tkáň (viz kap. 1.3). Exostózy jsou velmi variabilní co do počtu i velikosti, jejich tvorba je způsobena abnormálním vývojem chrupavčité tkáně (Tsang et al. 2014). Je známo, že pacienti s TRPS II jsou v průměru menší než pacienti s TRPS I či pouze s izolovanými exostózami, pravděpodobně z důvodu kumulativního efektu, neboť oba geny ovlivňují růst a vývoj skeletu (Ludecke et al. 1991).

Zdá se, že pacienti s menší delecí vykazují i mírnější stupeň mentální retardace oproti pacientům s rozsáhlejší delecí (Ludecke et al. 1991). U jednoho pacienta byla popsána normální inteligence a zjištěna přítomnost mikrodelece zasahující pouze oblast od genu *TRPS1* po gen *EXT1*. To naznačuje, že mentální retardace je u TRPS II způsobena delecí genů ležících mimo oblast ohraničenou geny *TRPS1* a *EXT1* (Ludecke et al. 1991). Kandidátním genem působícím mentální retardaci u TRPS II by mohl být proximálně se nacházející gen *CSMD3*, který je exprimován ve fetálním i adultním mozku. Na základě publikovaných výzkumů o rozsahu delecí u pacientů s TRPS II se zdá, že tento gen je neporušen u mentálně normálních pacientů, avšak deletován minimálně u části všech pacientů s TRPS II trpících mentální retardací (Ludecke et al. 1991; Riedl et al. 2004). Je tedy pravděpodobné, že haploinsuficience genu *CSMD3* by mohla být zodpovědná za mentální retardaci u pacientů s TRPS II.

Někdy jsou u pacientů s TRPS II popisovány i další abnormality, jako např. kožní defekty, laxity a hypermobilita kloubů, predispozice ke kostním frakturám, mikrocefalie, problém příjmu potravy v dětství, u novorozenců hypotonie, opožděný psychomotorický vývoj s pozdním nástupem řeči apod. (Vaccaro et al. 2005). Přítomnost či absence těchto a dalších znaků mohou být spojeny s rozsáhlejší delecí (tedy s delecí zasahující i mimo kritický LGCR vymezený geny *TRPS1-EXT1*) u jednotlivých pacientů, tedy s rozsáhlejším poškozením okolních genů a s tím spojenou i větší vlnou symptomů (Fantauzzo and Christiano 2012; Hou et al. 1995; Perez et al. 2012; Shanske et al. 2008). Dále byla popsána i větší náchylnost k urogenitálním a respiračním infekcím (Michalek et al. 2009). V jednotlivých případech byly zaznamenány i další abnormality, jako např. ztráta sluchu (Vantrappen et al. 1997), deficiencie růstového hormonu (Riedl et al. 2004), persistující kloaka (Ramos et al. 1992), rozštěp patra (Morioka 1999) jako další znaky LGS závislé na velikosti delece. K dalším zaznamenaným fenotypovým projevům patří případy trifalangeálních palců na ruce, které

mohou být spojeny i s polydaktylií, hypoplastickými falangy a mentální retardací spojenou s mikrocefalií (Tsang et al. 2014).

Bylo publikováno několik případů, kdy měl pacient s LGS neporušený gen *TRPS1* (McBrien et al. 2008; Pereza et al. 2012). Příkladem budiž případ dívky s typickým fenotypem LGS, která měla intersticiální mikrolepci o velikosti 7,5 Mb v chromozomové oblasti 8q23.3-q24.13, přičemž delece zahrnovala pouze gen *EXT1*, nikoli gen *TRPS1*. Kromě typických znaků LGS vykazovala předčasný nástup puberty, což zatím popsáno u LGS nebylo (Pereza et al. 2012). Ve srovnání s podobnými publikovanými případy se zdá, že čím distálněji leží proximální bod zlomu od genu *TRPS1*, tím méně má pacient typických znaků LGS. To je vysvětlováno domněnkou, že v těsné blízkosti genu mohou být umístěny regulační sekvence, jako např. enhancery či represory, jejichž delece může porušit funkci genu a dát tak vznik typickému fenotypu (McBrien et al. 2008). Alternativním vysvětlením je, že nově zformovaná chromozomální nerovnováha může způsobit „silencing efekt“ genu *TRPS1*, neboť delecí se tento gen dostane do neobvykle těsné blízkosti jiného genu (Pereza et al. 2012).

Další, v literatuře dosud ojedinělý, je případ chlapce s mnohočetnými exostózami, mentální retardací, epilepsií, faciální hypertrichózou a několika fenotypovými znaky typickými pro TRPS. Vyšetření u něj odhalilo *de novo* mikrolepci v chromozomové oblasti 8q24, která však zahrnovala jen gen *EXT1* a několik dalších genů lokalizovaných distálně od něj, přičemž proximálně ležící gen *TRPS1* nebyl postižen (Wuyts et al. 2002).

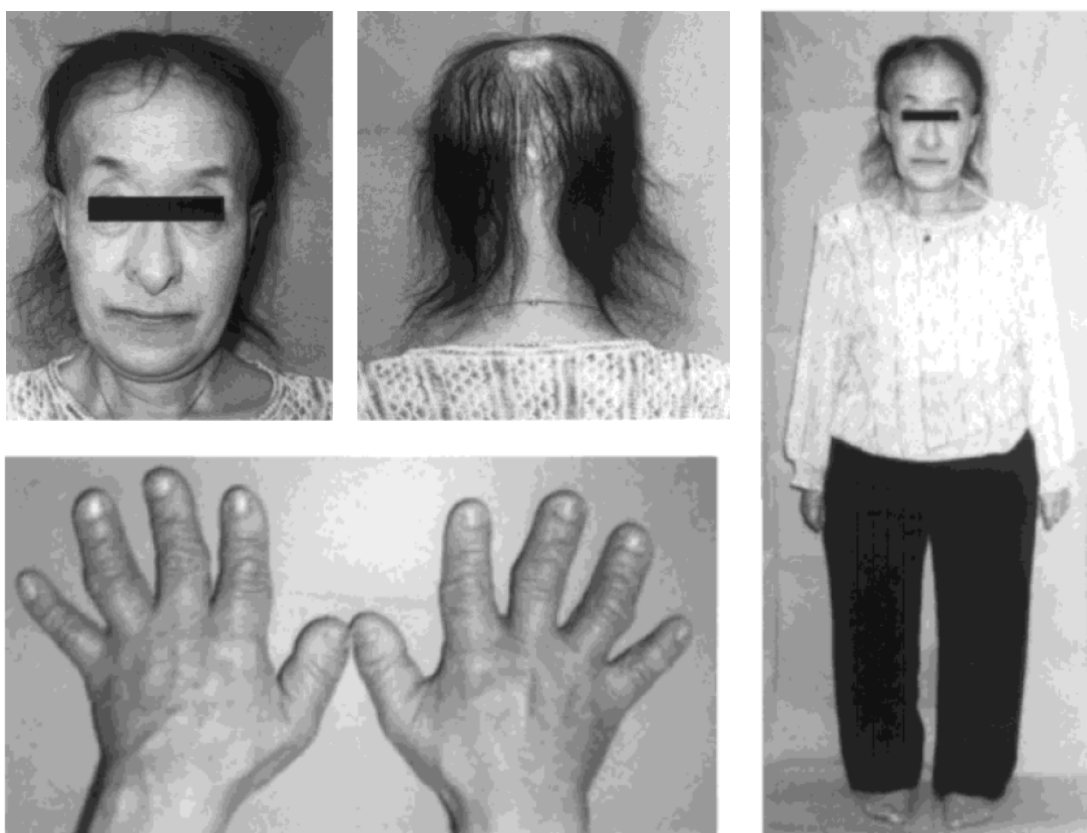
Zajímavým případem byla též dívka s mírným TRPS II, která měla jednu z nejrozsáhlejších delecí, které byly dosud u TRPS II zaznamenány; tato delece o velikosti 19,79 Mb zahrnovala více než 50 genů, včetně genů *TRPS1* a *EXT1*. Delece byla mozaikovitá, somatická (7% lymfocytů z periferní krve a 97% kožních fibroblastů) (Shanske et al. 2008).

Přestože TRPS se dědí autozomálně dominantně, u podtypu TRPS II se většinou jedná o sporadické případy, tedy *de novo* delecí (Tsang et al. 2014).

1.1.4 Trichorhinofalangeální syndrom, typ III

TRPS III se vyskytuje mnohem vzácněji než předchozí dva typy. Byl popsán jako poslední z podtypů, a to skupinou Sugio and Kajii (1984). Podtyp TRPS III se liší od TRPS II normální inteligencí a nepřítomností exostóz a od TRPS I extrémně malou postavou (spadající pod třetí percentil) z důvodu těžké růstové retardace, výraznou brachydaktylií způsobenou zkrácením metakarpálních kostí i všech článků prstů, přičemž prsty bývají navíc často vybočeny v proximálních interfalangeálních kloubech (Obr. 3) (Niikawa and Kamei 1986). Studie ukazují, že TRPS III je svou fenotypovou závažností až na okraji spektra projevů TRPS, tedy že pravděpodobně reprezentuje pouze extrémní klinické projevy TRPS I. Je to dáno tím, že TRPS III je způsoben specifickým typem mutací v genu *TRPS1*; konkrétně se jedná o *missense* mutace (tj. bodové) postihující výhradně exon 6, jehož převážná část kóduje DNA-vazebný GATA motiv zinkového prstu (Ludecke et al. 2001). Takto specificky mutovaný protein *TRPS1* má pravděpodobně sníženou afinitu k DNA způsobenou pozměněnou strukturou tohoto zinkového prstu, čímž dochází k manifestaci fenotypu TRPS III; předpokládá se totiž uplatnění dominantně negativního efektu, kdy dochází ke kompetici

s „wild-type“ proteinem TRPS1 vznikajícího z druhé, zdravé (tedy nemutované) alely, o další komponenty v multimerních transkripčních proteinových komplexech, zatímco pro zbývající typy mutací (typických pro podtypy TRPS I a TRPS II) se předpokládá efekt haploinsuficience (Ludecke et al. 2001). Tento názor postupně posilují i další studie, kdy u pacientů s typickým fenotypem TRPS III je nalézána *missense* mutace v exonu 6 genu *TRPS1* (Hilton et al. 2002; Kobayashi et al. 2002). V roce 2004 byly publikovány první dvě *missense* mutace v exonu 6, jejichž výsledkem byl mírnější fenotypový projev odpovídající TRPS I. Tyto mutace však byly lokalizovány mimo GATA-vazebný motiv zinkového prstu, zabraňovaly transportu proteinu TRPS1 do jádra, tudíž redukovaly jadernou koncentraci tohoto proteinu a vedly tedy k fenotypu TRPS I. Tyto poznatky jsou v souladu s modelem haploinsuficience užívaného vysvětlení vzniku typu TRPS I (Kaiser et al. 2004).



Obr. 3: Vzhled pacientky s TRPS III - jemné řídké vlasy, hruškovitý tvar nosu, dlouhé ploché philtrum, úzký horní ret, velké laterálně odstávající ušní boltce. Na spodním obrázku vzhled rukou: těžké zkrácení metakarpálních kostí i všech článků prstů (brachydaktylie), nápadné vybočení prstů v proximálních interfalangeálních kloubech. U této pacientky byla prokázána *missense* mutace (G→A) v nukleotidu 2723. Tato heterozygotní mutace vedla k substituci argininu na glutamin na pozici 908. Místo mutace je lokalizováno na vrcholu GATA DNA-vazebného motivu zinkového prstu. Takto mutovaný protein může dosáhnout jádra, neboť není poškozen jeho NLS, jeho afinita k DNA však může být nižší, popř. může mutovaný protein inhibovat vazbu normálního („wild-type“) proteinu TRPS1 a projevovat tím dominantně negativní efekt. Stejnou mutaci prokázali u sestry této pacientky. Tato mutace nebyla nalezena u žádné ze 100 zdravých kontrol, což dokazuje, že daná substituce není SNP (single nucleotide polymorphism). Navíc konverze G→A nukleotidu 2723 diagnostikovaná u této

ženy byla nalezena též u dalších dvou pacientů s fenotypem TRPS III, a sice chlapce z Nizozemska a u dívky z Německa (Ludecke et al. 2001). Tento nukleotid byl postižen i u rodiny popsané skupinou Nagai et al 1994. Zdá se tedy že, nukleotid na pozici 2723 je horkým mutačním místem („mutation hot spot“) pro TRPS III (Kobayashi et al. 2002).

1.1.5 Porovnání podtypů TRPS

Určit správný typ TRPS nebývá vždy jednoduché. Některé znaky nemusí být tak dobře zřetelné a vyvinuté, naopak jiné znaky, netypické pro daný syndrom, mohou být přítomné. TRPS vykazuje vysokou fenotypovou variabilitu, navíc při rozsáhlejších delecích chromozomové oblasti 8q24 typické pro TRPS II je klinická variabilita závislá na ztrátě dalších genů v postižené oblasti (Ludecke et al. 1995). Vzájemné porovnání podtypů TRPS a vyzdvižení typických fenotypových klinických znaků je shrnuto v tabulce 1 (Michalek et al. 2009).

Tab. 1: Klinické znaky asociované s různými podtypy TRPS syndromu. Vysvětlivky: +, znak typicky přítomen; -, znak typicky nepřítomen. Převzato a upraveno dle Michalek et al. 2009.

Klinické znaky	TRPS I	TRPS II	TRPS III
Kraniofaciální abnormality			
řídké vlasy	+	+	+
velké, laterálně odstávající uši	+	+	-
hruškovitý nos	+	+	+
prominující prodloužené philtrum	+	+	+
tenký horní ret	+	+	+
mandibulární micrognathia	+	+	-
microcephalie	-	+	-
vysoce klenuté patro	+	+	+
dentální abnormality	+	+	+
Ortopedická manifestace			
clino-brachydaktylie	+	+	+
kuželovité epifýzy (ruce)	+	+	+
křídlovitá lopatka	+	+	+
malá postava	+	+	+
mnohočetné exostózy	-	+	-
laxity či hypermobility kloubů	+	+	-
Mentální status			
mentální retardace	-	+	-
opožděný nástup řeči	-	+	-
psychomotorická labilita	-	+	-

1.1.6 Diagnostika TRPS

Diagnóza TRPS je založena převážně na přítomnosti klinických a radiologických znaků. Při diagnostikování trichorhinofalangeálního syndromu se musíme v první řadě zaměřit na typické klinické faciální znaky spojené s tímto syndromem. Tyto znaky, jakými jsou např. řídké vlasy, dlouhé a ploché philtrum, odstávající uši, jsou u všech pacientů s TRPS velice podobné, zatímco radiologicky patrné skeletální abnormality, jako např. kuželovité epifyzy (CSEs) či kyčelní změny jsou naopak velmi variabilní, a to dokonce i mezi členy jedné rodiny a dokonce i mezi monozygotními dvojčaty (Naselli et al. 1998).

U podtypu TRPS II je pak důležité zdokumentovat přítomnost exostóz, popř. přítomnost mentální retardace (Hilton et al. 2001). Ke správnému odlišení podtypů TRPS I a TRPS III lze použít metakarpofalangeální analýzu (metacarpophalangeal pattern profile, MCPP), kterou k rozlišení těchto dvou podtypů použil již Kajii et al v roce 1994 (Kajii et al. 1994). Analýza MCPP je grafická metoda užívaná k zobrazení délky tubulárních kostí ruky ve vztahu k sobě navzájem. Tato metoda je používána jako pomůcka pro potvrzení diagnózy mnoha vrozených malformací a kostních dysplázií, včetně TRPS (Poznanski and Gartman 1997 in Ludecke et al. 2001). Metoda spočívá ve změření délky všech 19 tubulárních kostí ruky z originálních radiografických snímků pacientů. Následně se musí spočítat odchylka („deviation“ neboli z-skóre) každé kosti od průměru pro odpovídající věk, pohlaví i národní příslušnost (Poznanski and Gartman 1997 in Ludecke et al. 2001). Odchyly jsou následně vyjádřeny jako násobky SDS (standard deviation score). V některých případech však může být velmi obtížné délku změřit, neboť metakarpy mohou být vyboulené a interfalangeální klouby mohou být vychýleny ze své osy, což vede k distorzi a zkreslení kosti na rentgenovém snímku. Touto analýzou odhalíme závažnější brachydaktylii pacientů s TRPS III oproti pacientům s TRPS I, která je zapříčiněna všeobecně zkrácením všech článků prstů i metakarpů. Analýza MCPP je však pouze pomocná, rozhodně se nejedná o jediný a výhradní nástroj pro diagnostiku TRPS III (Ludecke et al. 2001); na základě pouze této metody nelze diagnostikovat TRPS III (Kajii et al. 1994). Tak jako rozdíl mezi průměrnou výškou pacientů s TRPS I a TRPS III, tak i rozdíl v jejich metakarpofalangeálním profilu dokazuje, že pacienti s *missense* mutací mají sklon být závažněji postiženi oproti pacientům s jiným typem mutace (Ludecke et al. 2001). Analýza MCPP dokazuje, že růstová retardace kostí ruky (stejně tak jako výška celé postavy) je progresivní proces.

Po zhodnocení všech výše popsaných znaků a po vyslovení podezření na TRPS by měla být tato domněnka potvrzena genetickou analýzou. Potvrzení genetickou analýzou je užitečné hlavně u případů nevykazujících klasickou klinickou prezentaci syndromu. Genetická analýza by však neměla být pokládána za diagnostický „zlatý standard“, neboť příčinou TRPS I a TRPS III jsou mikrolece, které metody klasické genetické diagnostiky nezachytí a chromozomy se tak zdají být cytogeneticky v pořádku. Podtyp TRPS II je sice charakteristický větší delecí, nicméně jsou publikovány případy, kdy byl nalezen zdánlivě normální karyotyp (Ludecke et al. 1991; Turleau et al. 1982 in Tsang et al. 2014), což je způsobeno rozdílně velkou škálou chromozomových delecí v kritické oblasti u různých pacientů; v některých případech je delece rozsáhlejší a tedy zachytitelná, jindy zas může být nepatrná a

dostupnými (cyto)genetickými technikami neviditelná (Turleau et al. 1982 in Tsang et al. 2014). Z tohoto důvodu se jako vhodnější jeví metody molekulárně genetické (např. MLPA či přímé sekvenování genu), které odhalí i jednobodové mutace typické pro TRPS III.

Diagnostikování TRPS (především typu I) může být někdy pouhou náhodou. Vzhledem k tomu, že TRPS má široké klinické spektrum symptomů, které však v zásadě představují spíše kosmetické problémy, nevyhledají někteří pacienti lékařskou pomoc. Příkladem budiž případ rodiny, kdy byla lékařská pomoc vyhledána až ve třetí generaci. To naznačuje skutečnost, že prevalence TRPS je stále podhodnocena a měla by mu být věnována pozornost kliniků (Sendi-Naderi et al. 2010). Je však pravda, že pacienti vykazují i skeletální abnormality, jako např. kuželovité epifyzy středních či proximálních falangů, brachydaktylii či malformace kyčle. Tyto znaky však nemusí být typicky vyvinuté a jsou často odhaleny, jen pokud jsou cíleně vyhledávány (Giedion et al. 1973 in Malik et al. 2002). Podtypy II, resp. III, většinou bývají diagnostikovány z důvodu přítomnosti mnohočetných bolestivých exostóz tlačících na přilehlé nervy a cévy, resp. těžké brachydaktylie a výrazně malé postavy z důvodu obecného a progresivního zkracování všech falangů, metakarpů a některých dlouhých kostí (Kajii et al. 1994).

1.2 Gen *TRPS1*

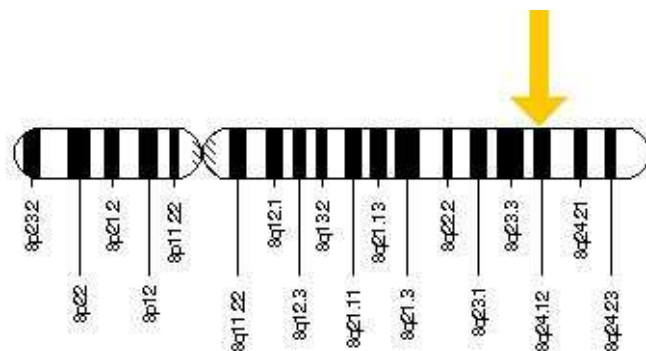
Samotný gen *TRPS1* identifikoval a poprvé popsal v roce 2000 Momeni et al. V tomto samém roce však skupina Chang et al. (2000) popsala gen *GC79* kódující unikátní multi-type zinc-finger protein asociovaný s apoptózou v rakovinných buňkách prostaty (Chang et al. 2000). Krátce na to se ukázalo, že je jedná o tentýž gen, jaký popsala skupina Momeni et al. (Chang et al. 2002). Dále je užíváno pouze názvu *TRPS1*, avšak v internetových genových databázích se lze setkat i s alternativním názvem *GC79*.

Gen *TRPS1* kóduje protein – jaderný transkripční faktor (transcription factor, TF) *TRPS1* – skládající se z 1281 aminokyselin. Ve struktuře tohoto proteinu se objevuje neobvyklá kombinace rozdílných typů motivů zinkových prstů (zinc-finger motifs, zf) včetně DNA vazebného motivu typu GATA a zinkových prstů podobných těm z rodiny IKAROS. Jedná se o jediný známý transkripční faktor, který ve své struktuře spojuje devět možných motivů zinkových prstů čtyř rozdílných typů (Momeni et al. 2000).

1.2.1 Lokalizace

Gen *TRPS1* byl zamapován na dlouhé raménko lidského chromozomu 8, konkrétně do oblasti 8q24.1 (Obr. 4) (Momeni et al. 2000).

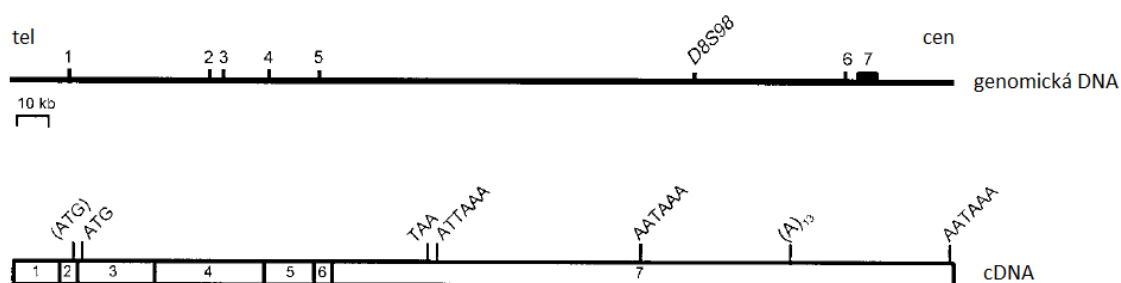
Tento gen je tedy lokalizován proximálně od tumor-supresorového genu *EXT1* (viz kap. 1.5). Jak již ale bylo zmíněno výše, byl tento gen objeven takřka zároveň i skupinou Chang et al., která jej pojmenovala *GC79*, ale zamapovala ho do chromozomové oblasti 8q23 (Chang et al. 2002). V literatuře se lze tedy setkat i s tímto místem lokalizace, popř. se uvádí region 8q23-q24.



Obr. 4: Lokalizace genu *TRPS1* v rámci chromozomu 8 (převzato z Genetics Home Reference, dostupné online na <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TRPS1>).

1.2.2 Struktura

Gen *TRPS1* se skládá ze sedmi exonů (Obr. 5), zahrnuje 260 500 bp genomické DNA (Momeni et al. 2000).



Obr. 5: Struktura genomické DNA a cDNA genu *TRPS1*. Genomická struktura genu *TRPS1* znázorňuje sedm exonů a vybraný DNA marker D8S98 zamapovaný do intronu 5. U struktury cDNA reprezentují otevřené boxy exony, dále jsou dány iniciační a terminační kodony, tři polyadenylační signály a poly(dA)-stretch ve 3' UTR; tel, telomera; cen, centromera. Převzato z Momeni et al. 2000.

1.2.3 Exprese

Gen je transkribován ve směru od telomery k centroměře. Kompletní sekvence genu čítá 10 011 bp (Momeni et al. 2000), avšak jeho otevřený čtecí rámeček („open fading frame“, ORF) má velikost 3885 bp (dle NCBI). První exon na 5' konci je nekódující a představuje tak 5' UTR. Kódující region je tedy tvořen exony 2-7, avšak někteří autoři hovoří o možnosti, že druhý exon (158 bp) může být předmětem alternativního sestřihu a v některých případech může chybět. V takovém případě by kódující úsek začínal na třetím nukleotidu třetího exonu (Ludecke et al. 2001; Momeni et al. 2000).

Velká, 5530 bp dlouhá, 3'-UTR nepřekládaná oblast exonu 7 obsahuje 16 kopií motivu AUUUA. Je známo, že tento motiv je rozpoznávacím signálem pro degradaci mRNA prostřednictvím endonukleázové aktivity proteozomálního komplexu (Jarrousse et al. 1999 in Momeni et al. 2000), což poukazuje na možnost regulování množství proteinu TRPS1 pomocí jeho celulárních koncentrací mRNA.

Gen *TRPS1* je exprimován ve více než 50 různých adultních i fetálních tkáních (Chang et al. 2002; Kunath et al. 2002; Malik et al. 2001; Momeni et al. 2000). Na myším modelu bylo prokázáno, že gen *Trps1* vykazuje v počátcích (okolo 11. dne) embryonálního vývoje komplexní, dynamické expresní vzorce především v oblasti obličeje, vyvíjejících se končetinových pupenů, vlasových folikulů a centrálním nervovém systému (hlavně oblasti středního mozku a koncového mozku) (Fantauzzo et al. 2008a). V průběhu pokračujícího embryonálního vývoje (okolo 14. dne) myši se pak exprese více soustřeďuje směrem k distálnímu konci faryngeálních oblouků a distální oblasti obličeje. Podkožní oblast čenichu, oblast maxilly a mandibuly vykazují velmi silnou expresi genu *Trps1*, zatímco epidermis je z exprese tohoto genu vyloučena. V počátcích je gen exprimován v celé vznikající končetině, později se exprese soustřeďují nejprve do formujících se chrupavek (především chondrocytů; od kloubu směrem k hypertrofickým chondrocytům se gradient exprese snižuje) a posléze do kloubů předních i zadních končetin (zápěstí, loket, rameno, kotník, kyčel) (Fantauzzo et al. 2008a). Obecně byla exprese detekována v okolí většiny vyvíjejících se chrupavek, včetně kostí obličeje, kostí vnitřního ucha, žeber, obratlů (i intervertebrálních disků) a dlouhých kostí (Kunath et al. 2002). Exprese tohoto genu byla nalezena též v pokožce obklopující vyvíjející se oči, a to hlavně v místech budoucího formování obočí (Fantauzzo et al. 2008a). Malik et al. (2001) našli expresi *TRPS1* také ve člancích prstů a ve femorální hlavičce vyvíjející se kyčle. Odhalená místa exprese jsou tedy ve shodě a dobře korelují s klinickými nálezy u pacientů s TRPS, tj. exprese tohoto genu je vysoká speciálně v těch strukturách, kde pacienti s TRPS vyvinou patologii, což by mohlo znamenat, že pozorované defekty u pacientů plynou z vývojových chyb, které se dějí selektivně na těchto místech (Malik et al. 2001). Skupina Malik et al. detekovala nejvyšší expresi genu přibližně 13. den embryonálního vývoje myši, poté začala exprese dramaticky klesat. To by mohlo navíc značit, že podstatné fenotypové znaky TRPS vyplývají z defektů, které se uskutečňují během formativních fází fetálního vývoje, a to ve tkáních s vysokou expresí genu *TRPS1* (Malik et al. 2001).

Vysoká exprese genu *TRPS1* byla nalezena i v dalších adultních tkáních – v prostatě, v intersticiálních buňkách varlat, ve stroma ledvin, v prsních žlázách, v bránici, ve vaječniku, ve vyvíjejících se svalech včetně jazyka, v mezenchymu vyvíjejících se plic - avšak nikoliv v plicním epitelu. Podobně byla detekována exprese i v mezenchymu střeva, avšak ne v endodermu (Malik et al. 2001). Nižší stupně exprese byly zaznamenány v adultních tkáních jater, srdce, dělohy a mozku. Oproti tomu však, ve fetálních tkáních ledvin, plic, jater, srdci a mozku byla detekována mnohem nižší exprese genu *TRPS1* ve srovnání s expresí v odpovídajících adultních tkáních. To by mohlo naznačovat, že během dospívání může být gen *TRPS1* zahrnut v růstové supresi těchto několika vyvíjejících se tkání (Chang et al. 2002). Navíc jsou tyto poznatky zajímavé z toho důvodu, že v těchto orgánech nejsou popisovány žádné fenotypové změny, přestože k expresi dochází u plodu i u dospělých jedinců. To může odrážet buď neesenciální roli v těchto místech či klinicky „tichou“ manifestaci abnormálního vývoje a funkce (Malik et al. 2001).

Analýza exprese genu *Trps1* u myši během postnatálního koloběhu („cycling“, cyklování) vlasových folikulů a postnatální morfogeneze vlasových folikulů odhalila, že

protein je lokalizován do jader buněk dermální papily a vysoce proliferačních epiteliálních buněk vlasových folikulů (Fantauzzo et al. 2008a). V této dermální papile je gen postnatálně exprimován a exprimován je rovněž v mezenchymálních buňkách obklopujících vlasový folikul. Dále bylo také zjištěno, že během časného vývoje kůže, je exprese genu *Trps1* velmi dynamická, neboť klesá v epidermis, zatímco zároveň stoupá v dermis (Fantauzzo et al. 2008a). Tedy *Trps1* je silně exprimován ve vyvíjejícím se vlasovém folikulu, s nejvyšší expresí v mezenchymálním kompartmentu (dermální papila) a dodatkovou expresí v epiteliálním kompartmentu (matrix, cortex) (Fantauzzo et al. 2008a). Tato exprese může být esenciální nejen pro vlastní vývoj vlasu v pozdních stádiích, ale je též vyžadována nezávisle k indukovaní formování vlnitého vlasu (Malik et al. 2002).

Gen *TRPS1* je tedy exprimován v dermální papile a v mezenchymálních buňkách obklopujících vlasový váček, v případě mutace genu *TRPS1* je jeho exprese markantně redukována v epidermis a ve vlasových folikulech ve srovnání se zdravými jedinci (Ito et al. 2013).

1.2.4 Mutace

Je známo na desítky mutací postihujících gen *TRPS1* (Chen et al. 2011; Ludecke et al. 2001; Momeni et al. 2000; Nan et al. 2013).

Podtyp TRPS I je způsoben delecí či jinou mutací v genu *TRPS1* (pokud je to bodová *missense* mutace, pak musí být tato mimo GATA zřetel domény), zatímco podtyp TRPS III je způsoben výhradně *missense* mutací v GATA DNA-vazebném motivu zinkového prstu exonu 6 genu *TRPS1* (Ludecke et al. 2001). *Missense* mutace je stav, kdy je jedna kódovaná aminokyselina zaměněna (substituována) za jinou. Manifestace závažného fenotypu TRPS III nastává i tehdy, je-li aminokyselina zaměněna za jinou aminokyselinu s podobnými vlastnostmi, neboť daná změna se týká exonu 6, což je kritická a konzervovaná oblast proteinu (Hilton et al. 2002). V roce 2004 byly publikovány první dvě *missense* mutace v exonu 6, které vedly k fenotypu TRPS I. Tyto mutace sice byly lokalizované do exonu 6, avšak mimo GATA zřetel domény. Zabraňovaly tak transportu proteinu do jádra, a tudíž redukovaly jadernou koncentraci tohoto proteinu (Kaiser et al. 2004).

Gen *TRPS1* postihují především delece, které mohou být různě velké; zaznamenány byly delece o velikosti jednoho, dvou či několika málo párů bází, které měnily čtecí rámec (jednalo se tedy o tzv. „frameshift“ mutace), čímž vznikaly předčasné terminační kodony a tím zkrácené, nefunkční proteiny postrádající důležité domény (Nan et al. 2013), ale též delece zahrnující podstatnou část dlouhého raménka chromozomu 8 (Hilton et al. 2002). Dále jsou často popísány i případy bodových jednonukleotidových *nonsense* či *missense* mutací (Ito et al. 2013), sestřihových mutací (Ludecke et al. 2001), paracentrických inverzí zahrnujících pruh 8q24.11 (Sasaki et al. 1997), inzercí (Vaccaro et al. 2005) či složitějších přestaveb – např. balancovaných translokací (Hou et al. 1995; Nardmann et al. 1997). Publikován byl i případ dívky s parciální trisomií distální části dlouhého raménka chromozomu 8 zděděnou od své matky, která však překvapivě měla mozaikovitou 8q23.3→q24.13 delecí. Obě vykazovaly mírný fenotyp TRPS I, přestože každá nesla jiný

karyotyp. Jednalo se o první případ parciální trisomie distální části 8q zděděné od rodiče s intersticiální delecí části 8q a fenotypem TRPS I (Naritomi and Hirayama 1989).

Dle literatury je přibližně polovina případů pacientů s TRPS I nositeli mutace zděděné autozomálně dominantně, druhá polovina jsou případy sporadické, zapříčiněné mutací *de novo* (Chen et al. 2011; Corsini et al. 2014; Hilton et al. 2002; Ludecke et al. 2001).

V roce 2001 byla publikována studie genotypo-fenotypových korelací TRPS, ve které u 50 z celkových 57 nepříbuzných jedinců (88%) s fenotypem TRPS zachytili mutaci v genu *TRPS1*, která přímo způsobovala jejich TRPS I či TRPS III syndrom (Ludecke et al. 2001). Takto vysoké procento detekovaných mutací (88 %) naznačuje, že *TRPS1* je hlavním, ne-li jediným, genem, jehož mutace dá vzniknout syndromům TRPS I a TRPS III. Z těchto 50 mutací se u 30 z nich jednalo o sporadické případy a u zbylých 20 se jednalo o familiární případy. U sporadických případů byli vyšetřeni i „zdánlivě“ zdraví rodiče i jejich příbuzní – u nich však žádná mutace nebyla nalezena. To poukazuje na kompletní penetranci mutací v genu *TRPS1*. Nalezené mutace byly rovnoměrně rozloženy v genu *TRPS1*; jednalo se o devět „out of frame“ delecí (1-14 bp), sedm „out of frame“ insercí (1-4 bp) – tyto mutace byly v drtivé většině tzv. „mutace se ztrátou funkce“, neboť syntetizované proteiny měly poškozený či chybějící minimálně jeden jaderný lokalizační signál (NLS), a proto neměly předpoklady k dosažení jádra. Navíc tyto mutantní proteiny postrádaly C-terminální IKAROS-like zinc-finger motiv („double zinc-finger motif of IKAROS“), který je pokládán za nezbytný pro protein-proteinové interakce a zprostředkovávání formací homo- nebo heterodimerů (Sun et al. 1996 in Ludecke et al. 2001). Dále bylo nalezeno i 19 jednonukleotidových substitucí, z nichž devět bylo transverzí a 10 tranzicí. 13 z těchto jednonukleotidových substitucí vytvářelo předčasný terminační kodon, což vedlo ke vzniku zkráceného transkriptu. Předpokládá se, že vznikající zkrácené mRNA z důvodu mutace jsou rychle degradovány v dráze nesmyslných mRNA („nonsense-mediated mRNA decay“). Pět bázových substitucí způsobovalo *missense* mutaci a jedna jednonukleotidová substituce postihla sestřihové místo intronu 6 (sestřihová mutace), což vedlo k přeskočení exonu 6. Všechny *missense* mutace byly nalezeny v exonu 6, který kóduje předpokládanou GATA DNA-vazebnou doménu zinkového prstu. U jednoho pacienta z této studie byla dokonce nalezena jen mutantní (a nikoliv i normální) alela genu *TRPS1*, tento pacient byl tedy homozygotní, nesoucí dvě shodně mutované alely genu *TRPS1*, což je velmi neobvyklý nález u dominantně děděných chorob. Zároveň toto zjištění dokládá, že v případě mutací *TRPS1* je i homozygotní stav slučitelný se životem (Ludecke et al. 2001).

V březnu roku 2015 publikovali Maas et al. (2015) studii genotypo-fenotypových korelací, která svým rozsahem předčila do té doby nejrozsáhlejší výše zmíněnou studii skupiny Ludecke et al. z roku 2001. Tato studie čítající 103 pacientů s fenotypem TRPS se však od té z roku 2001 lišila, neboť pracovala se souborem pacientů, kteří měli všichni již dříve cytogeneticky či molekulárně diagnostikovanou mutaci v genu *TRPS1*. Potvrdila se přitom dřívější tvrzení – TRPS je klinicky velmi variabilní, jedinci s *missense* mutací v exonu 6 genu *TRPS1* představují extrémní klinické spektrum TRPS (tedy TRPS III) a jedinci s rozsáhlejší delecí v chromozomální oblasti 8q24 (tedy TRPS II) vykazují často mírnou mentální retardaci.

Jinak však nebyly nalezeny žádné fenotypové korelace v závislosti na typu mutace (Maas et al. 2015).

Zkrácené proteiny postrádající C-terminální IKAROS-like doménu nemají schopnost se přes tuto doménu vázat s ostatními proteiny. Předpokládá se, že proteiny s *missense* mutací jsou schopné dosáhnout jádra a formovat dimery či multimery skrze své IKAROS-like zř domény. Tyto mutantní proteiny ale mají pravděpodobně sníženou afinitu k DNA, z důvodu modifikované konformace. Výjimkou jsou *missense* mutace v GATA doméně, ty způsobují neschopnost proteinu vázat se na sekvence DNA a ovlivňovat tak transkripci; tyto mutantní proteiny jsou tedy transkripčně neaktivní (Momeni et al. 2000).

Skupina Nardmann et al. (1997) se zabývala parentálním původem *de novo* mutovaného (resp. deletovaného) genu. U dvou třetin pacientů našli delecii na paternálně zděděném chromozomu, u jedné třetiny delecii na maternálně zděděném chromozomu. Zdá se tedy, že u TRPS mírně převažuje vznik delecce na paternálně zděděné alele. Převaha paternálně odvozené *de novo* delecce byla nalezena i u jiných mikrodelečních syndromů, např. Miller-Dieker syndromu (Schwartz et al. 1988 in Nardmann et al. 1997) či Wolf-Hirschhorn syndromu (Johnson et al. 1994 in Nardmann et al. 1997). Všeobecně se předpokládá, že paternální predispozice reflektuje větší počet buněčných dělení mužských zárodečných kmenových buněk, které vykazují celoživotní mitotickou proliferaci, zatímco oocyty jsou ustrnulé v diktyotením stádiu prvního meiotického dělení (Chandley 1991 in Nardmann et al. 1997). Avšak na druhou stranu existují i syndromy, jejichž příčinou je delecce na maternálně zděděném chromozomu, tedy delecce vzniklá během oogeneze (Grimm et al. 1994 in Nardmann et al. 1997). Každopádně pozorované maternální i paternální delecce a přenosy u mnoha rodin vylučují roli genového imprintingu u této choroby (Nardmann et al. 1997).

Zdá se, že gen *TRPS1* je normálně exprimován ze dvou alel, tedy bialelicky, přičemž všechny heterozygotní mutace vedou ke ztrátě jedné funkční kopie genu *TRPS1*, což vede k fenoménu zvanému haploinsuficience. Následkem toho pravděpodobně dochází k výrazné redukci koncentrace proteinu TRPS1 oproti původnímu, nemutovanému stavu, a to asi na polovinu. U všech doposud publikovaných případů (kromě jednoho) se u pacientů jednalo o jednu mutovanou alelu (tedy monoalelickou mutaci), zatímco druhá alela byla původní, zdravá, tzv. „wild-type“. Proto bylo navrženo že TRPS vzniká v důsledku genové haploinsuficience a že se tedy jedná o haploinsuficienční syndrom (Ludecke et al. 2001; Momeni et al. 2000). Avšak výzkum Malika et al (2001) představil i alternativní hypotézu, a sice že zkrácené proteiny z důvodu mutace postrádající GATA- a/nebo IKAROS-type zř doménu fungují jako dominantní antagonisté či inhibitory „wild-type“ proteinu, což je příčina, proč se TRPS dědí autozomálně dominantně (Malik et al. 2001). Přestože na heterozygotním mutantním myším modelu nelze rozlišit průkazně mezi těmito dvěma molekulárními mechanismy, přiklání se dnes většina vědců k myšlence, že podtypy TRPS I a TRPS II jsou způsobeny haploinsuficiencí genu *TRPS1* (a tedy snížením koncentrace proteinu) z důvodu delecce, *nonsense* mutace či sestřihové mutace, zatímco typ TRPS III (který je způsoben *missense* mutací v GATA doméně zinkového prstu kódované exonem 6) je

zapříčiněn dominantně negativním efektem mutantních proteinů TRPS1, které brání zbývajícím „wild-type“ TRPS1 proteinům ve své funkci, čímž v podstatě dochází k redukci aktivity těchto zbývajících „wild-type“ proteinů (Kaiser et al. 2004). Teoreticky může být za vznikem TRPS I i ztráta funkce z důvodu špatné lokalizace proteinu zapříčiněná mutací v NLS (Hilton et al. 2002).

Bylo publikováno několik případů aberací v chromozomové oblasti 8q23.3-8q24.1, které nezasahovaly gen *TRPS1*, a přesto došlo k manifestaci TRPS (tzv. „TRPS I-like phenotype“). Například případ reciproké balancované translokace mezi chromozomy 2 a 8, kdy bod zlomu na chromozomu 8 ležel přibližně 325 kb před promotorem genu *TRPS1*. V této oblasti byly navíc detekovány i adice a delece nukleotidů, což indikuje, že translokace byla pravděpodobně zprostředkována mechanismem NHEJ („Non-Homologous End Joining“). Předpokládá se tedy, že způsobený fenotyp probanda by mohl být způsoben deregulovanou expresí genu *TRPS1* a narušením genomické architektury *cis* regulačních elementů „5'-downstream“ od oblasti genu *TRPS1*, tedy přestavbami a změnami pozic regulačních elementů ve vztahu k jejich původním cílům (Crippa et al. 2014). Druhým takovým případem byl familiární TRPS I zapříčiněný balancovanou translokací mezi chromozomy 8 a 13, kdy bod zlomu ležel 87 kb od 5' konce *TRPS1*, a tedy samotný gen *TRPS1* nebyl poškozen. K manifestaci fenotypu však přesto došlo, a to pravděpodobně proto, že výsledkem translokace bylo umístění evolučně konzervovaného nekódujícího VISTA enhancer elementu z oblasti 13q21.31 za 5' konec *TRPS1*. Nový enhancer měl za následek zvýšenou expresi genu *TRPS1* („over-express“). Z důvodu absence mikrohomologie na úrovni nukleotidové sekvence se pravděpodobně opět jednalo o opravení translokačních zlomů chromozomů prostřednictvím molekulárního mechanismu NHEJ (David et al. 2013).

1.2.5 Role genu *TRPS1* u jiných syndromů a chorob

Patologická funkce genu *TRPS1* by však mohla hrát roli i u jiných syndromů než jen TRPS. Fantauzzo et al. (2008) zjistili, že snížená exprese („underexpression“) genu *TRPS1* je pravděpodobně zodpovědná za fenotyp Ambrasova syndromu (Ambras syndrome - AS; OMIM #145701). AS je raritní forma vrozené hypertrichózy, kdy je tělo (včetně ramen, uší, obličej, čela či očních víček) pokryto dlouhými jemnými chlupy. Kromě toho mají pacienti abnormální faciální fenotypové znaky – baňatý nos, malé antevertované nostrily (nosní dírky), dlouhé prominentní philtrum s hlubokým žlábkem, úzkou horní hranici retní červeně („upper vermilion border“), a též kostní abnormality (mnohočetné exostózy, postaxiální zárodečnou hexadaktylii aj.). AS a TRPS u člověka tedy vykazují opačný fenotyp, co se týče vlasového porostu, avšak ostatní postižené části těla (defekty vlasových folikulů, kraniofaciální a skeletální abnormality) jsou u obou syndromů shodné. Nutno ovšem dodat, že kromě vlasového porostu nalézáme i další rozdíly mezi pacienty s AS a TRPS; pacienti s TRPS (především typu I) často vykazují skeletální abnormality, které nejsou charakteristické pro pacienty s AS (např. kuželovité epifýzy, malformace kyčle a malá postava). Vysvětlení, proč skeletální abnormality nalézané u pacientů s TRPS I nepozorujeme také u všech pacientů s AS a proč tyto dva syndromy reprezentují opačné vlasové fenotypy, může být

několik: (1) Exprese proteinu TRPS1 může být postižena jen v určité podmnožině tkání ve velmi odlišných časových bodech vývoje. (2) TRPS1 je protein (TF) schopný působit jako transkripční represor i jako aktivátor, a to v závislosti na kontextu a množství přítomného proteinu. (3) Protein TRPS1 je schopný vazby na mnoho ko-faktorů s rozdílnými funkcemi, a tak může v různém stupni a v různé míře transkripčně regulovat jak geny, které aktivují růst vlasů, tak i geny, které ho reprimují; v případě AS byly nalezeny nízké hladiny transkriptu *TRPS1*, což poukazuje na skutečnost, že nevyvážená transkripční regulace může vyústit až v excesivní vlasový fenotyp.

Skupina Fantauzzo et al. (2008) měla k dispozici tři pacienty s AS s přestavbou chromozomu 8, všichni tři přitom měli body zlomu lokalizované v oblasti 8q22-8q24 (Fantauzzo et al. 2008b). Byla proto postulována hypotéza, že pozorovaná snížená exprese genu *TRPS1* (až o 97% oproti zdravým rodičům!) je zapříčiněná pozičním efektem², který pravděpodobně narušuje regulační elementy genu *TRPS1*. Kurčení přesné příčiny excesivního vlasového růstu na molekulární úrovni a k potvrzení, zdali jsou opravdu narušeny regulační elementy kontrolující transkripci tohoto genu, využila skupina mutantní myši model pro studium hypertrichózy („Koa mutant mice“). Bylo zjištěno, že pokud byl proximální inverzní bod zlomu lokalizován 791 kb „upstream“ od genu *Trps1* (tedy zlom nenarušoval ORF genu), došlo k vytvoření nového Sp1 vazebného místa³ (= GC box) a umístění tři dalších Sp1 míst do jeho blízkosti. Skupina postuluje, že dodatečné Sp1 místo ve spojitosti s mnohačetnými Sp1 místy přítomnými v promotoru genu vytvořené inverzí může reprimovat transkripci genu *Trps1* během vývoje. Zdá se tedy, že zatímco ztráta funkce *TRPS1* způsobená intragenovou mutací vede k řídkým vlasům, narušená regulace genu a nedostatečná exprese proteinu následkem pozičního efektu na gen *TRPS1* může vést k nadbytečnému či ektopickému vlasovému růstu.

Geny podněcující u ostatních savců plnější srst a růst chlupů – tj. geny, které byly umlčeny v průběhu evoluce pravděpodobně skrz represi prostřednictvím *TRPS1* či dalších genů – jsou odhaleny, odmaskovány u hypertrichozy AS, která je u člověka považována za atavismus (tedy návrat ancestrálního fenotypu). Intragenová mutace v genu *TRPS1* a poziční efekt způsobující narušení regulačních elementů toho samého genu zde vyúsťují v rozdílné vlasové fenotypy avšak lokalizované do stejných orgánů, což podtrhuje důležitost genu *TRPS1* ve vývinu vlasů (Fantauzzo et al. 2008b). Jedná se o první popsany potenciální „long-range“ poziční efekt na expresi genu *TRPS1*, přičemž tento poziční efekt snižuje expresi *TRPS1*, což je příčinou hypertichozy u AS (Fantauzzo et al. 2008b).

Dlouhé rámečko chromozomu 8, konkrétně oblast 8q24, je kromě genu *TRPS1* místem lokalizace i dalších genů, např. proto-onkogenu *MYC* („Myelocytomatosis oncogene“) a genu *EIF3S3* („Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3“). Tento region je regionem často amplifikovaným v rakovinných buňkách prsu. Bylo prokázáno, že

² Poziční efekt je definován jako pozměnění v genové expresi způsobené změnou pozicí genu vztahené k jeho původnímu chromozomovému okolí (Kleinjan and van Heyningen 1998 in Fantauzzo et al. 2008b).

³ Sp1 (Specificity protein 1) je specifický promotorový zinc-finger transkripční faktor, který reguluje expresi genů vazbou na GC a GT sekvence (= tedy vazbou na tzv. „Sp1 binding sites“) v promotorové oblasti cílových genů (Kadonaga et al. 1987 in Fantauzzo et al. 2008b).

právě gen *TRPS1* je aplikován spolu s geny *MYC* a *EIF3S3* v těchto rakovinných buňkách (Radvanyi et al. 2005). Dále bylo také pomocí imunohistochemické analýzy prokázáno, že je gen *TRPS1* nadbytečně transkribován ve více než 90 % časných i pozdních stádiích rakovinných buněk prsu ve srovnání s normálními, zdravými tkáněmi. Navíc vysoké hladiny exprese tohoto genu v porovnání s jinými studovanými geny naznačují, že protein TRPS1 je vysoce tumor-specifický a vykazuje komplexní expresi napříč populací pacientů (>90% pozitivní) s rakovinou prsu. Vysoký stupeň exprese v rozličných stádiích rakoviny prsu naznačuje, že gen může hrát důležitou roli v proliferaci a/nebo přežívání rakovinných buněk. Nepřítomnost exprese *TRPS1* na proteinové úrovni v mnoha normálních tkáních a naopak „over-exprese“ již v časných stádiích vývoje rakoviny prsu dělá z tohoto genu dobrý potenciální diagnostický marker pro tento typ rakoviny. Přestože jiné práce (např. Chang et al. 2000) detekovali expresi v některých adultních tkáních, skupina Radvanyi et al. (2005) opakovaně nedetekovala značnější expresi tohoto genu ve zdravých adultních tkáních. Zatím není známo, zdali „over-exprese“ proteinu TRPS1 mění regulaci růstu normálních či rakovinných buněk. Je možné spekulovat, že produkt genu *TRPS1* reguluje signalizaci steroidního receptoru, neboť bylo zjištěno, že komplex TRPS1-RNF4 (RING Finger protein; viz kap. 1.3.4) se váže na steroidní receptor. Všechny tyto výsledky poukazují na spojitost mezi *TRPS1*, regulací členů rodiny GATA a signalizací skrz steroidní receptor u rakovinných buněk prsu (Radvanyi et al. 2005).

Gen *TRPS1* by mohl hrát roli i v případě rakoviny prostaty. V androgenně závislých lidských rakovinných buňkách prostaty může být exprese genu *TRPS1* (v publikaci označeného jako *GC79*) reprimována fyziologickými koncentracemi androgenů zprostředkovaně přes androgenní receptor; bylo zjištěno, že exprese genu *TRPS1* je vysoká při nízkých hladinách androgenů v prostatických, androgeně-závislých, rakovinných buňkách. Model fungování androgeny reprimovatelného apoptotického genu *TRPS1* předpokládá, že při fyziologických podmínkách a hladinách testosteronu, je *TRPS1* reprimován, volný testosteron se váže na androgení receptor na DNA, což s využitím dalších potenciálních modulačních transkripčních faktorů vede k růstu nádoru prostaty. Odstranění androgenů (testosteronu, např. kastrací) vede k disociaci androgeního receptoru z DNA, zvýšení hladin *TRPS1*, přičemž TF *TRPS1* přestává být reprimován, váže se na DNA a indukuje apoptózu rakovinných buněk prostaty přímo či přes apoptotické modulační faktory (Chang et al. 2002). Lze tedy spekulovat, že gen *TRPS1* by mohl být zahrnut v inhibici buněčného růstu a apoptóze, což by mohl být důležitý poznatek pro budoucí léčbu rakoviny prostaty. Nutno dodat, že zatím nebyl předložen žádný důkaz pro zvýšené riziko vzniku rakoviny prostaty u pacientů s TRPS.

1.3 Protein TRPS1

Protein TRPS1 je sekvenčně specifický, DNA-vazebný jaderný protein, který patří do rodiny transkripčních faktorů zinkových prstů typu GATA. U obratlovců je známo šest GATA-vazebných proteinů (TF), které jsou vysoce homologní a konzervované; obsahují dvě domény zinkových prstů typu GATA a dělí se do dvou podskupin: GATA-1, -2 a -3 jsou exprimovány

primárně v liniích krevních buněk a regulují klíčové aspekty hematopoézy (Pevny 1991; Tsai 1994 in Malik 2001); GATA-4, -5 a -6 jsou exprimovány zejména v srdci a ve střevech a jejich absence v germinální linii má za následek časně embryologické defekty v utváření srdce a vývoji endodermu (Laverriere et al. 1994 in Malik et al. 2001). Tyto GATA transkripční faktory tedy hrají nezastupitelnou roli v individuálním vývoji obratlovců i bezobratlých. Znakem, který spojuje proteiny této rodiny, je přítomnost jednoho či dvou zinkových prstů typu GATA obsahujících konsenzuální sekvenci Cys-XN-Cys-X₁₇-Cys-NX-Cys (C₄). Výše zmíněné GATA proteiny u obratlovců obsahují dva zinkové prsty typu GATA, naopak bezobratlí exprimují třídu těchto esenciálních proteinů obsahujících pouze jeden zinkový prst typu GATA. Protein TRPS1 je jediným dalším proteinem obratlovců s GATA motivem a ještě navíc se výše uvedené skutečnosti vymyká, neboť obsahuje pouze jeden C₄ zinkový prst typu GATA. Souhrně se tedy GATA transkripční faktory podílí na buněčné proliferaci, diferenciaci, onkogenezi a genové regulaci, a tedy podobnou funkci by mohl zastávat i příbuzný gen *TRPS1* (Chang et al. 2002).

Myší protein *Trps1* má 1282 AA a 93% podobnosti s lidským proteinem, zatímco protein u rodu *Xenopus* má 1272 AA a 73% podobnosti s lidským proteinem. To značí, že protein TRPS1 je konzervován mezi obojživelníky (*Xenopus*) a savci (*Mus musculus*), což poukazuje na důležitost tohoto proteinu ve vývoji a udržení homeostázy (Malik et al. 2001).

1.3.1 Lokalizace

Protein TRPS1 je lokalizován v jádře, jedná se o jaderný transkripční faktor (TF). Skupina Kaiser et al. (2003) zjistila zajímavou věc, a sice že v jádrech lidských fibroblastů je protein TRPS1 lokalizován v různě velkých, jakoby bodově roztroušených strukturách, které početně varírují mezi jedním až čtyřmi na buňku. To znamená, že protein TRPS1 v jádře vykazuje nehomogenní distribuci a je zde lokalizován v rozsáhlých avšak málo početných jaderných tělískách (Kaiser et al. 2003b).

Protein TRPS1 byl detekován také v cytoplasmě fibroblastů, avšak v mnohem menší míře než v jádře (Kaiser et al. 2003b) a dále byl slabý výskyt tohoto proteinu zaznamenán i v cytoplasmě keratinocytů pokožky. Tyto poznatky by mohly indikovat nějakou další funkci tohoto proteinu mimo jádro, která však zatím není známa (Fantauzzo et al. 2008a).

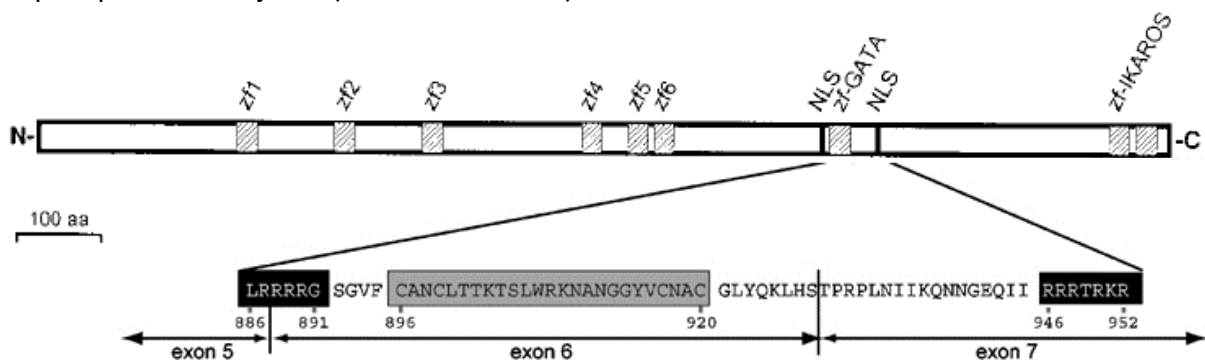
1.3.2 Struktura

ORF predikuje slabě bazický (pH=7,495) polypeptid složený z 1281 aminokyselin s vypočtenou molekulární hmotností 141580 daltonů. Předvídaná sekvence proteinu má dva potenciální jaderné lokalizační signály („nuclear localisation signal“, NLS) a také neobvyklou kombinaci devíti domnělých motivů „zinkových prstů“ („zinc-finger motifs“) čtyř rozdílných typů, včetně těch, které jsou podobné motivům IKAROS („IKAROS-like zinc-finger motif“) a dále pak GATA-type zř. vazebné sekvence, skrze které se váže na DNA (Momeni et al. 2000).

První tři motivy zinkových prstů (zf1-3; Obr. 6) jsou typu C₂H₂ a sdílejí konsenzuální sekvenci C₂X₁₄H₂ bez jakékoliv podobnosti v proteinové databázi. Motivы zinkových prstů 4-6 (zf4-6; Obr. 6) sdílejí konsenzuální sekvenci C₂X₁₂H₂. Při hledání v proteinových databázích

bylo odhaleno několik málo podobností mezi motivy 4, 6 a DNA-vazebnými doménami zinkových prstů ostatních proteinů, avšak funkce těchto domén je stále neznámá. Sedmý motiv zinkového prstu je typu C₂C₂ (CXNCX₁₇CNXC) a vykazuje podobností s více než 160 sekvencemi proteinů, a to především se členy rodiny GATA DNA-vazebných transkripčních faktorů; bylo ukázáno, že právě tato doména je schopna se specificky vázat na konsenzuální sekvence (A/T)GATA(A/G) a jí příbuzné sekvence nalézané na DNA v kontrolních oblastech mnoha vývojově regulačních genů (Malik et al. 2001), což poukazuje na možné zahrnutí v regulaci genové exprese (Chang et al. 2002). Tato sekvence je 100% konzervovaná u myši i žab rodu *Xenopus*, což dokazuje důležitost této oblasti pro funkci proteinu, tedy pro vazbu proteinu na DNA (Malik et al. 2001). Poslední dva tandemové zinkové prsty typu C₂H₂ se nalézají na C-konci a vykazují vysoký stupeň podobnosti s téměř třemi sty jinými motivy zinkových prstů proteinů z mnoha rozdílných organismů. Nejvyšší stupeň podobnosti byl přitom nalezen se dvěma charakteristickými C-koncovými zinkovými prsty lymfoidních transkripčních faktorů z rodiny IKAROS (Georgopoulos 1997 in Malik et al. 2001). Dvojitá doména zinkového prstu transkripčních faktorů typu IKAROS je známá jako zprostředkovatel protein-proteinových interakcí a umožňuje tak těmto TF vzájemné formování homo- a heterodimerů (Sun et al. 1996).

GATA-vazebný motiv zinkového prstu je olemován dvěma regiony kódujícími bazické aminokyseliny, které jsou předpokládány jadernými lokalizačními signály (NLS; Obr. 7) – první na pozici 886-891 (LRRRRG) a druhý na pozici 946-952 (RRRTRKR). Avšak studie intrabuněčné lokalizace proteinu TRPS1 provedené skupinou Kaiser et al. odhalily, že pouze druhý motiv (tedy RRRTRKR) funguje jako skutečný NLS; mutace postihující poslední arginin v tomto motivu zabránila translokaci mutantního proteinu do jádra, zatímco mutantní proteiny postrádající konzervovanou GATA zf doménu a většinu motivu LRRRRG byly stále schopné jádra dosáhnout, a je tedy nepravděpodobně, že by byl tento motiv odpovědný za transport proteinu do jádra (Kaiser et al. 2004).



Obr. 6: Struktura proteinu TRPS1 s predikovanými devíti proteinovými motivy – šrafované boxy reprezentují motivy zinkových prstů (zf), vertikální linie zobrazují předpokládané jaderné lokalizační signály (NLSs). Lokalizace motivu zinkového prstu typu GATA („GATA-type zinc finger“) a lokalizace motivu zinkového prstu podobného motivům IKAROS („IKAROS-like zinc finger domain“) je též znázorněna (Momeni et al. 2000). Aminokyselinová sekvence v motivu zinkového prstu typu GATA v exonu šest vyznačena šedě, aminokyselinová sekvence potenciálních NLSs podbarvena černě (Kaiser et al. 2004).

Jako mimořádně důležitá ve struktuře proteinu se jeví aminokyselina alanin na pozici 919. Tento alanin se nachází mezi dvěma cysteiny (aa CNAC) v exonu 6 a je evolučně velmi konzervován u všech savčích GATA a GATA-like zinkových prstů, což naznačuje důležitost pro normální strukturu i funkci GATA zinkového prstu. Záměna této aminokyseliny za jinou (tedy *missence* mutace) pravděpodobně vede k porušení GATA zf struktury. Záměnu tohoto alaninu za jinou aminokyselinu popsali nezávisle na sobě skupiny Lüdecke et al. (2001) i Hilton et al. (2002), tato pozice je tedy místem opakujících se mutací, je lokalizována do GATA zf domény a pacienti s touto mutací vykazují fenotyp TRPS III.

Závěrem lze tedy říci, že protein TRPS1 je unikátní transkripční faktor, neboť je to zatím jediný známý protein, který ve své struktuře kombinuje GATA-type a IKAROS-type zink finger motivy a navíc obsahuje i další dva zf motivy typu C₂C₂ a C₂H₂. Mohl by tak být prvním členem nové třídy „multi-type zink-finger“ transkripčních faktorů. Jeho GATA zf doména se váže na konsenzus GATA sekvence DNA a ostatní zf domény mohou fungovat v transaktivaci a rekrutování jaderných faktorů, které modulují regulaci genové exprese.

1.3.3 Funkce

Transkripční faktory (aktivátory stejně tak jako represory) vystupují v celé škále protein-proteinových interakcí v transkripčních komplexech, mohou se vázat na DNA a ovlivňovat tak expresi cílových genů. Právě „multi-type zink finger“ protein TRPS1 je jedním z takových transkripčních faktorů.

Malik et al. (2001) provedli úplně první funkční studii TRPS1. Došli k závěru, že TRPS1 vykazuje sekvencně specifickou transkripčně represivní aktivitu na procesy, které jsou závislé na TF typu GATA (tj. na geny regulované GATA transkripčními faktory) (Malik et al. 2001). Tato aktivita je přitom závislá na přítomnosti C-terminální IKAROS-like zink finger domény. Tato skupina také navrhuje, že geny, jejichž aktivita je závislá na GATA TF, mohou být umlčeny částečně srkze mechanismus zahrnující působení TRPS1.

Předpokládá se, že protein TRPS1 tvoří homo- či heterodimery s ostatními IKAROS-like TF, aby mohl vykonávat svou aktivitu, neboť jeho C-terminální double zink finger motiv sdílí velký stupeň (72%) podobnosti s tímto motivem proteinů rodiny IKAROS, které jsou známé právě tvořením homo- a heterodimerů díky této doméně (Ludecke et al. 2001; Sun et al. 1996).

Skupina Malik et al. (2002) chtěla zjistit funkci domény GATA-type zf. Využila myšího modelu s cílenou delecí čtvrtého exonu, který kóduje pouze GATA-type zf, a s delecí patnácti dalších aminokyselin vyžadovaných pro vazbu na DNA. Jejich výzkum odhalil, že heterozygotní myši s deletovanou GATA doménou mají redukovanou a zpožděnou enchondrální osifikaci a vykazují faciální anomálie, které se dobře překrývají s nálezy u pacientů s TRPS, zatímco myši s homozygotní delecí v GATA doméně vykazují kompletní absenci specializovaných sensorických chloupků normálně nalézáných v charakteristických seskupeních podél horní čelisti. Mutovaná alela genu *Trps1* byla asociována i s obecnými defekty vývoje srsti: průměrný počet vlasových folikulů přítomných na jednotku plochy povrchu dorzální pokožky je redukován na 50% u novorozenech homozygotních myší a

zhruba střední počet folikulů je nalézán u heterozygotních novorozených myší. Překvapivě však homozygotní myši umírají časně po narození (do 6 h) z důvodu vyvinutí progresivního neonatálního selhání respirace, plynoucího z mechanických anomálií hrudní páteře, skoliózy a nefyziologického zakřivení žeber. Avšak i heterozygoti s věkem vyvinou určitou thorakální kyphoskoliózu a objeví se u nich strukturální deficit v kortikálních a trabekulárních kostech. U mnoha novorozených myších homozygotů i dospělých heterozygotů byly popsány anomálie brady ve formě mikrognathie i abnormálně klenutá patra (Malik et al. 2002).

U pacientů s TRPS je jedním z hlavních fenotypových znaků i brachydaktylie. Myši heterozygoti však tento znak nevykazují, což je ale možná způsobeno tím, že malá velikost myších falangů znemožňuje detekci nepatrných změn (zvláště pak když nejsou asociovány se syndaktylií či jinými velkými abnormalitami). Dále byl podrobně studován i femur, místo častých patologií u pacientů s TRPS. Výzkum odhalil, že myši s mutací v jedné alele *TRPS1* (tedy heterozygoti) mají signifikantně redukovaný femorální objem, redukovanou kostní denzitu a že je tento kvantitativní defekt odražen v morfologii trabekulární kosti (tedy v kostních trámečcích). Na tomto myším modelu však nebyly nalezeny některé vývojové abnormality femorální hlavičky popisované u TRPS pacientů. Možným vysvětlením by mohlo být, že tato patologie u lidí reflektuje postoj a váhu, což u kvadripedů není. Absence perfektního překryvu mezi fenotypem lidí a myší navíc může být dána také druhovou rozdílností či esenciálními, modulačními funkcemi ostatních peptidových domén proteinu *TRPS1* (Malik et al. 2002).

Všechny výše uvedené poznatky přímo dokazují úlohu GATA-type zřetelivého motivu v regulaci vývoje kostí i vlasů a též naznačují, že skeletální abnormality zdůrazňované při popisu TRPS jsou jen extrémním projevem generalizované kostní dysplázie (Malik et al. 2002).

Již typický fenotyp pacientů poukazuje na skutečnost, že by tento gen mohl být rovněž důležitý ve specifických aspektech regulace vlasového růstu a faciální morfogeneze. Tato myšlenka se ukázala jako správná, neboť bylo prokázáno, že gen je specificky exprimován v jádrech mezenchymálních buněk během morfogeneze vlasového folikulu a že je též asociován s proliferací epitheliálních papilárních buněk ve vlasovém folikulu (Suemoto et al. 2007).

Z výzkumu myší s mutantním *Trps1* se dále ukazuje jako průkazné, že v chrupavčité růstové ploténce reguluje TF *Trps1* diferenciaci a zvyšuje proliferaci chondrocytů, indukuje apoptózu u terminálně diferencovaných chondrocytů v růstových ploténkách (Suemoto et al. 2007). Tato regulace se děje skrze interakce s několika signálními molekulami (viz kap. 1.3.4). Dále byla zjištěna jeho funkce i při formování nefronů při vývoji ledvin (Gai et al. 2011).

V roce 2012 bylo publikováno, že některé genetické variace genu *TRPS1* mohou ovlivňovat geometrii kyčle či denzitu kostní hmoty, která je měřena na podkladě BMD („Bone mineral density“). Bylo zjištěno, že určité jednonukleotidové polymorfismy (SNP) mohou být asociovány s délkou femorálního krčku. Autoři předpokládají, že gen *TRPS1* bude mít vliv spíše na vlastnosti dlouhých kostí; zejména délka femorálního krčku je dána balancí mezi proliferací chondrocytů a apoptózou a maturací osteoblastů během růstu, což je v souladu se zatím známými funkcemi *TRPS1*. Skupina dále ukazuje, že gen *TRPS1* (resp. SNP v genu

TRPS1) vykazuje spojitost s femorálními fenotypovými projevy souvisejícími s lidskou osteoporózou. To je velmi důležitý objev, neboť identifikace genů, které regulují BMD a kostní geometrii by pomohla lépe porozumět etiologii osteoporózy, či vést k lepší predikci rizika fraktur a k novým a lepším možnostem léčby (Ackert-Bicknell et al. 2012). Zjištění, že by gen *TRPS1* mohl být kandidátním genem pro BMD, ukázaly i dalšími výzkumy; na myším modelu bylo potvrzeno, že gen *Trps1* rozdílně moduluje BMD v závislosti na pohlaví a že jeho polymorfismy jsou asociovány s BMD mezi muži a ženami jinak, tedy že gen *TRPS1* funguje jako primární, pohlavně specifický regulátor BMD, a tutíž je tento gen důležitý při skeletálním vývoji (Wang et al. 2014).

V roce 2013 byla identifikována nová funkce genu *Trps1* – kontrolování mitotické progresy v chondrocytech. Ztráta funkčního genu *Trps1* u myši vedla k nárůstu počtu buněk ustrnulých v mitóze a následně k defektům segregace chromozomů. Na základě tohoto pozorování bylo zjištěno, že protein *Trps1* funguje jako regulátor histonové deacetylase v chondrocytech, a to mechanismem interakce se dvěma histon deacetylázami *Hdac1* a *Hdac4*, jíž zvyšuje jejich aktivitu. Protein *Trps1* bychom tak mohli označit jako důležitý pozitivní regulátor chromatinové histondeacetylázové aktivity v chondrocytech během mitózy. Na molekulární úrovni vede ztráta *Trps1* k hyperacetylaci histonu H3, následkem toho je snížena kondenzace chromatinu a *Trps1*-deficientní chondrocyty se akumulují v prometafázi. Toto je první důkaz, jak může být kontrola mitózy spojená s regulací diferenciací chondrocytů epigenetickým mechanismem. Akumulace *Trps1*-deficientních mitotických buněk chondrocytů může být potlačena „overexpresí“ *Hdac4* (Wuelling et al. 2013).

Dohromady všechny tyto poznatky podporují názor, že tento unikátní a atypický GATA transkripční faktor hraje důležitou roli ve vývoji vlasů, utváření kostní trámčiny a skeletu obecně a dále že může mít i roli v udržování adultní skeletální hmoty („kostní homeostáza“), přičemž tyto funkce jsou závislé především na přítomnosti GATA-type zř domény.

1.3.4 Interakce s DNA a jinými molekulami

Bylo prokázáno, že sedmý zř motiv proteinu *TRPS1* se váže na GATA konsenzuální sekvence DNA. Tento protein tedy funguje jako transkripční regulátor, ovlivňuje expresi cílových genů, přičemž je schopen se vázat jak na tandemové (T/A)GATA(A/G) (= WGATAR), tak na inverzní GATA konsenzuální sekvence (Malik et al. 2001).

Bylo předloženo, že se TF *TRPS1* chová jako sekvenčně specifický transkripční represor, neboť se ukázalo, že myší *Trps1* může svou vazbou reprimovat transkripční aktivitu GATA-4, přičemž tato transkripčně represivní funkce *TRPS1* je závislá na přítomnosti IKAROS-like zř domény na C-terminálním konci, resp. na posledních 119 aminokyselinách (Malik et al. 2001).

Na základě tohoto zjištění se začaly objevovat další práce, které potvrzovaly, že protein *TRPS1* může transkripčně reprimovat další cílové geny skrze specifické vazby ke GATA konsenzus sekvencím v jejich promotorech, přičemž většina z těchto genů je exprimována převážně v kostní tkáni. V každém jednotlivém případě mutace konsenzus

GATA vazebného miesta znemožnila proteínom TRPS1 zprostředkovanou represi transkripce cílového genu (viz dále).

Napierala et al. (2005) ve svých studiích ukazují, že během vývoje enchondrální kosti TF TRPS1 reprimuje expresi genu RUNX2 („Runt-related transcription factor 2“), který je hlavním regulátorem diferenciací osteoblastů a maturace chondrocytů (Napierala et al. 2005) a zároveň také ukazují, že myší *Trps1* funguje jako negativní regulátor mineralizace, moduluje formování mineralizované kostní matrix, a je tedy esenciální pro formování kosti (Napierala et al. 2009).

Dále se TF TRPS1 může vázat skrz GATA vazebnou sekvenci do proximálního promotoru (*Bglap*) osteokalcinového genu a suprimovat tak jeho expresi, čímž se protein TRPS1 stává regulátorem (represorem) osteokalcinové transkripce (Piscopo et al. 2009). Osteokalcin je jeden z nejhojnějších nekolagenních proteinů v kostní extracelulární matrix a je exprimován a uložen v osteoblastech, chondroblastech a odontoblastech během mineralizace extracelulární matrix. Osteokalcinová exprese je též regulována hormonálně a zároveň také přes RUNX2, který se též váže do promotorové oblasti osteokalcinového genu. TF TRPS1 se do promotoru váže i v případě, že je RUNX2 mutován. Dále TRPS1 moduluje formaci mineralizované kostní matrix v diferencujících se bunkách osteoblastů; tento TF tedy negativně reguluje pozdní stadia diferenciací osteoblastů, což je očividné z jeho efektu na osteokalcinovou expresi a mineralizaci (Piscopo et al. 2009).

Protein TRPS1 reprimuje také androgeny indukovanou expresi PSA („Prostate-specific antigen“) v prostatických rakovinných buňkách. „Overexpresi“ TRPS1 v androgen-dependentních lidských rakovinných buňkách prostaty inhibovala transkripci PSA, který je důležitým markrem rakoviny prostaty. Tyto výsledky naznačují roli proteinu TRPS1 v androgení regulaci exprese genu *PSA* (van den Bemd et al. 2003).

Výzkum skupiny Suemoto et al. (2007) odhalil, že myší protein *Trps1* je represorem exprese genu *Stat3* („Signal transducer and activator of transcription 3“), který střídavě kontroluje proliferaci chondrocytů a další osud chondrocytů v růstové ploténce, a to regulací exprese cyklinu *DI* a *Bcl2*. Nežádoucí aktivace genu *Stat3* způsobená nízkou expresí genu *Trps1* vede k pozorovaným vlasovým abnormalitám. Je možné, že lokální inhibice aktivovaného lidského *Stat3* by mohla pacientům s TRPS zlepšit růst vlasů (Ito et al. 2013). Myši s mutovaným genem *Trps1* navíc vyvinuly chondrodysplázii z důvodu snížené proliferace chondrocytů a poklesem apoptózy v růstových ploténkách. Tato (stejně jako další) studie tak dokazuje, že gen a tedy i protein TRPS1 je regulátorem chondrocytové proliferace, diferenciací a apoptózy skrze kontrolu exprese *Stat3* (Suemoto et al. 2007).

Chondrocyty růstové chrupavky podstupují regulovaný proces proliferace a diferenciací, který vede k longitudinálnímu růstu kostí. Abnormální organizace buněk v růstové ploténce způsobená nesprávnou regulací může vést ke vzniku malé postavy a skeletálních deformit. Balance mezi proliferací a diferenciací je kontrolována a regulována na mnoha úrovních, včetně zpětnovazebné smyčky *Ihh/PtHrp*. A právě TF TRPS1 se přímo váže na GATA vazebná místa na promotoru *PTHrP*, čímž suprimuje transkripci *PTHrP*; TRPS1 tedy negativně reguluje expresi genu *PTHrP*. Nedostatek proteinu *Trps1* vede k „overexpresi“

PTHrp, což inhibuje hypertrofickou diferenciaci chondrocytů. To může postnatálně vyústit v abnormální vývoj kosti, růstovou retardaci a finálně tedy v malou postavu. Tato práce opět potvrzuje, že protein *Trps1* je vyžadován k udržení normální organizace chondrocytů v růstové ploténce (Nishioka et al. 2008).

Protein *Trps1* se váže také na promotor genu *SOX9* a přímo tím reprimuje jeho expresi. Gen *SOX9* kóduje protein *SOX9*, který je regulátorem kmenových buněk vlasových folikulů („hair follicle stem cell regulator“) a kontroluje proliferaci epithelia folikulu (Fantauzzo et al. 2012). Expresi genu *TRPS1* společně se signalizací *Shh* za normálních okolností zajišťují vyváženou regulaci exprese *SOX9* v proliferujících epiteliálních buňkách vlasových folikulů, přičemž *Shh* funguje jako pozitivní regulator genu *SOX9*, zatímco *TRPS1* jako repressor transkripce *SOX9* (Fantauzzo et al. 2012).

Nečekaně bylo objeveno, že TF *TRPS1* může fungovat nejen jako dosud známý transkripční represor, ale i jako transkripční aktivátor (což je mimochodem funkce typická pro *GATA* proteiny). Bylo prokázáno, že protein *TRPS1* zvyšuje expresi mnoha TF lokalizovaných ve vlasovém folikulu, jako např. *Prdm1* („Krüppel-type zinc-finger transcription factor“), *Lhx2* („LIM homeobox TF“), *Sox18* a *Sox21* („SRY box-containing TF“), a to tak, že se přímo váže na promotory těchto cílových genů a aktivuje tak jejich transkripci (Fantauzzo and Christiano 2012).

Při studiu mutovaných chlupů u myší skupina Fantauzzo et al. zjistila, že jsou tyto redukovány co do počtu, nepravidelně rozmístěné a opožděné ve svém vývoji ve srovnání s „wild-type“ (Fantauzzo et al. 2008a). Další analýzy odhalily, že tyto defekty jsou způsobeny disturbancí *Wnt* signalizace a chybnou expresí několika TF a ECM proteinů regulovaných skrze TF *Trps1*. Ukázalo se, že *Trps1* zvyšuje expresi třech *Wnt* inhibitorů (*Wif1*, *Apcdd1*, *Dkk4*) ve vlasových folikulech a že se tato transkripční regulace opět děje přes přímou vazbu na promotory těchto cílových genů. *Wnt* signální dráha funguje velmi časně během formování vlasového folikulu, podílí se především na smrti buněk v keratogenní oblasti vlasové cibulky. Předpokládá se, že aktivace sekretovaných a membránově vázaných *Wnt* inhibitorů prostřednictvím proteinu *TRPS1* na počátku formace folikulu, způsobí utlumení *Wnt* signalizace jak v epidermální plakodě, tak v dermální části vyvíjejícího se folikulu, čímž se dovolí zahájení formace vlasního vlasu (Fantauzzo and Christiano 2012). Časná organogeneze vlasových folikulů je tedy regulována skrze řadu genů, které mohou být (a jsou) regulovány prostřednictvím TF *TRPS1*. Identifikace proteinu *TRPS1* jako nového regulátoru *Wnt* signálních drah ukazuje na zásadní roli tohoto TF jako regulátoru transkripční hierarchie ve vlasových folikulech, a to v epiteliálním i mesenchymálním kompartmentu kůže v časných stádiích morfogeneze vlasových folikulů (Fantauzzo and Christiano 2012).

I aktivita samotného TF *TRPS1* musí být nějak regulována. Děje se tak skrze interakce s několika molekulami, které s tímto TF interagují, ovlivňují tak jeho aktivitu i funkci. Úplně první identifikovanou molekulou interagující s tímto proteinem byla molekula *LC8a* („dynein light chain“), tedy lehký řetězec dyneinu (Kaiser et al. 2003). Protein *LC8a* byl původně popisován výhradně jako cytoplazmatická molekula sloužící k transportu, avšak nyní se zdá, že *LC8a* nebude jen jednoduchá molekula pro intracelulární transport, neboť bylo nalezeno

již mnoho různých molekul extrémně rozdílných velikostí i biologických funkcí bez vzájemné souvislosti mezi sebou, u kterých byla prokázána interakce s LC8a (např. Herzig et al. našli molekulu LC8a také v jádře) (Herzig et al. 2000 in Kaiser et al. 2003b). Kaiser et al. dokázali, že protein LC8a složený z 89 aminokyselin má svou funkci i v jádře, kde vytváří stabilní komplex s proteinem TRPS1. K formování komplexu přitom může docházet prostřednictvím dvou různých oblastí na TRPS1 ohraničujících sedmý zinc-finger motiv; interakce se může dít buď prostřednictvím regionu A (AK 635-723), který obsahuje tři předpokládané motivy zinkových prstů (zf 4-6), ale také prostřednictvím regionu B (AK 1182-1281), který obsahuje IKAROS-like zinc-finger doménu. Bylo ukázáno, že zvýšené množství molekuly LC8a redukuje kvantitu formovaných komplexů TRPS1-DNA. Molekula LC8a je v závislosti na dávkách schopna prokazatelně snížit (regulovat) navazování TRPS1 na GATA konsenzuální sekvence; přítomnost LC8a koreluje s redukcí aktivity TRPS1 jako represoru způsobem závislým na koncentraci. Právě interakce těchto dvou proteinů redukuje vazbu TRPS1 na GATA konsenzuální sekvence a potlačuje transkripčně represivní aktivitu proteinu TRPS1 (Kaiser et al. 2003b). Suprese funkce TRPS1 prostřednictvím interakce s LC8a může být dosažena konformační změnou TRPS1 po navázání LC8a. TRPS1 je transkripční represor (represor GATA-zprostředkované transkripce); předpokládá se, že inhibice jeho aktivity prostřednictvím molekuly LC8a vyústí ve zvýšení exprese cílových genů. Tyto geny jsou zatím neznámé, avšak pravděpodobně budou aktivní ve vývoji chondrocytů a vlasových folikulů. Dobrým kandidátním genem by mohl být např. apoptózu regulující *Bcl-2* neboť hraje centrální, stěžejní roli ve vývoji kostí a koloběhu vlasových folikulů (Muller-Rover et al. 1999 in Kaiser et al. 2003b), tudíž by mohl být relevantní i pro patogenezi TRPS. Malik et al. ukázali, že N-terminálně zkrácený protein TRSP1, který postrádá LC8a vazebný region A, je stále schopný potlačovat GATA-regulovaný gen, *in vivo*, takže transkripčně represivní aktivita je závislá na přítomnosti 119 aminokyselin nejbližší C-konci řetězce (Malik et al. 2001).

Molekula LC8a vykazuje homogenní distribuci v cytoplazmě, ovšem zajímavé je, že byla nalezena také v jádrech cca 60 % všech analyzovaných primárních lidských fibroblastů (avšak je možné, že subcelulární lokalizace LC8a varíruje v závislosti na rozdílných buněčných typech, podmínkách či fázi buněčného cyklu). V těchto jádrech byla lokalizovaná do bodově roztroušených oblastí stejně jako TRPS1, a to dokonce do těch samých, čili tyto molekuly se svou lokalizací překrývaly. Molekuly TRPS1 a LC8a jsou tedy ko-lokalizovány v jádře (avšak ne v cytoplazmě) ve shodných, bodově roztroušených shlucích, což naznačuje funkci tohoto proteinového komplexu v těchto vymezených strukturách v jádře, ale ne v cytoplazmě.

Stejná skupina (tedy Kaiser et al.) identifikovala i druhou molekulu interagující s TRPS1, kterou byl RNF4 (RING finger protein) o délce pouze 190 aminokyselin (Kaiser et al. 2003a). RNF4 se váže na region o velikosti 200 aminokyselin (aa 985-1184) TF TRPS1, tento region však nemá žádný predikovaný motiv pro protein-proteinové interakce a nachází se mezi GATA a IKAROS-like zf motivy. TRPS1 fyzicky interaguje s RING finger proteinem RNF4, který je mj. ko-regulátorem několika odlišných mechanismů genové transkripce; RNF4 například interaguje s androgením receptorem a funguje jako ko-aktivátor androgen-zprostředkované transkripce (Moilanen et al. 1998 in Kaiser et al. 2003a). Represivní funkce

proteinu TRPS1 při GATA-zprostředkované transkripci je inhibována molekulou RNF4, což naznačuje, že RNF4 může modulovat transkripci *TRPS1* a funkci genového produktu, konkrétně že je negativním regulátorem aktivity TRPS1. Již Malik et al. (2001) ukázali, že TRPS1 reprimuje GATA závislou genovou aktivaci, proto skupina Kaiser et al. předpokládá ko-represní efekt při vazbě RNF4. Při analýze však odhalili kompletní supresi represní aktivity TRPS1 po přidání RNF4. Studie tedy odhalila dosud neznámou funkci RNF4, který zjevně funguje jako ko-aktivátor GATA faktorů zprostředkovávajících genovou transkripci. Tedy RNF4 funguje spíše jako více obecný ko-regulátor, jako přemostující faktor podílející se na koordinaci aktivit rozmanitých transkripčních signálů faktorů přičemž TRPS1 může být jedním z těchto faktorů. Avšak není známo, do jaké míry je RNF4 zahrnut v patogenezi TRPS, protože není známo, zdali je RNF4 exprimován např. v chondrocytech či vlasových folikulech. Je však známo, že proteiny RNF4 a TRPS1 jsou exprimovány také v jiných tkáních, které nejsou postiženy při TRPS; tyto tkáně asi nejsou tak citlivé k disbalanci koncentrace těchto proteinů ve srovnání s postiženými tkáněmi. Protein RNF4 je tedy supresor TRPS1-zprostředkované genové represe (Kaiser et al. 2003a). Obě molekuly identifikované skupinou Kaiser et al. tak suprimují transkripčně represivní aktivitu proteinu TRPS1.

Aktivita transkripčních faktorů je často kontrolována posttranslačními modifikacemi. Protein se váže na svá cílová místa a ovlivňuje je tak, ale zároveň protein sám interaguje s různými molekulami, které tak regulují jeho aktivitu. Protein – transkripční faktor – TRPS1 je sumoylován na mnoha místech, a to skrz interakci s UBC9 (SUMO-1-conjugating enzyme). Hlavními sumoylačními místy jsou lyzinové zbytky na pozicích 1192 a 1201. Mutace obou těchto míst vedou k téměř kompletní ztrátě represivních schopností TRPS1. Za pomoci enzymové mašinérie modifikuje enzym UBC9 cílový protein malým, ubiquitinu příbuzným, modifikačním proteinem („small ubiquitin-related modifier protein“ = SUMO); protein SUMO-1 je na tento cílový protein kovaletně navázán. Sumoylace představuje první potvrzenou posttranslační modifikaci proteinu TRPS1 (Kaiser et al. 2007). Tyto výsledky naznačují, že sumoylace na C-konci proteinu by mohla být hlavním mechanismem, který reguluje transkripčně represivní aktivitu proteinu TRPS1, neboť se ukázalo, že „overexpres“ přirozeného enzymu UBC9 posiluje transkripční represi zprostředkovanou přes TRPS1. Také se zdá, že nadměrná exprese *UBC9* specificky posiluje sumoylaci lyzinových reziduí TRPS1, přesto však mechanismus, jakým se to děje, není objasněn (Kaiser et al. 2007).

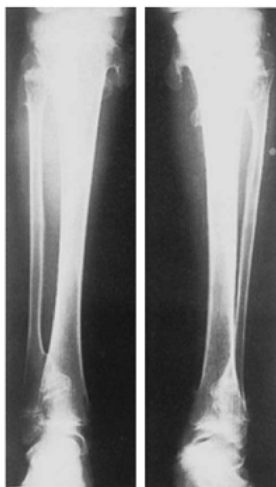
Všechny výše uvedené skutečnosti poukazují na důležitou roli genu *TRPS1* v časných stádiích formování vlasového folikulu, v chondrogenezi, diferenciaci osteoblastů a vývoje skeletu obecně.

1.4 Dědičné mnohočetné exostózy

Dědičné mnohočetné exostózy (hereditary multiple exostoses, HME; exostoses, EXT; OMIM #133700) je název heterogenního, autozomálně dominantně dědičného kostního onemocnění charakterizovaného přítomností mnoha benigních chrupavkou překrytých⁴

⁴ Exostózy jsou pokryté zesíleným periostem (okosticí), která těsně přiléhá na chrupavčitou „čepičku“. S věkem se chrupavčitá čepička osifikuje, stává se tenčí a lokálně může až vymizet (Hennekam 1991).

kostních výrůstků (=osteochondromů, tumorů, exostóz) na plochách kostí s incidencí přibližně 1/50 000 (Cook et al. 1993; Schmale et al. 1994; Wuyts et al. 1998) a téměř kompletní penetrancí, která činí asi 96 % (Pannier and Legeai-Mallet 2008; Schmale et al. 1994; Wicklund et al. 1995). Mnohočetné exostózy se mohou vyskytovat v izolované formě či jako součást mikródelečných syndromů. Tvoří téměř 50 % benigních kostních tumorů a 10-15% všech kostních tumorů. Někteří pacienti mají ojedinělé tumory, avšak asi 60-70% všech pacientů má exostózy mnohočetně lokalizované na skeletálním systému a většinou také pozitivní rodinnou historii (Solomon 1964 in Hennekam 1991). Kromě exostóz vykazují tito pacienti i jiné skeletální deformity včetně nízkého vzrůstu. Počet exostóz bývá vysoce variabilní, průměrný počet varíruje mezi 15-18, avšak výjimkou není ani přítomnost osmi desítek lézí na RTG snímku (Hennekam 1991). Vycházejí z růstových plotének a jsou většinou nejpočetnější v epifyzárních oblastech dlouhých tubulárních kostí, kde jsou lokalizovány nejčastěji v místech úponů šlach velkých svalů, tedy především na distálním konci femuru a proximálním konci tibie a fibuly (Obr. 7), a to až u 90 % pacientů. Dále také na proximálním konci humeru a femuru, distálním konci tibie, ulny, radiu či fibuly (Hennekam 1991). Obecně se však tyto tumory mohou vyvinout na jakékoliv kosti, který má chrupavčitý původ, tedy i na lopatce, obratli, žebrech, pánvi či sternu a dokonce i na bazi lebni, kde byly též zaznamenány (Raskind et al. 1995). To dokazuje i fakt, že obličejová část většinou nebývá postižena (Hennekam 1991).



Obr. 7: Radiologický snímek dlouhých tubulárních kostí: na proximálním konci tibie jsou viditelné mnohočetné exostózy (Vaccaro et al. 2005).

Exostózy se začínají vyvíjet krátce po narození, diagnostikované bývají u většiny pacientů v průměru ve třech letech věku (Schmale et al. 1994) a jejich velikost i počet roste během dětství až do uzavření růstových plotének na konci puberty. První výrůstky bývají nalézány na tibií či scapule, pravděpodobně proto, že jsou to místa v dětství nejlépe viditelná (Solomon 1963 in Hennekam 1991). Byly popsány i případy spontánního vymizení exostóz během dětství či puberty (Callan 1975 in Hennekam 1991; Copeland 1985 in Hennekam 1991). Takovéto případy jsou vysvětlovány ustáváním růstu výrůstku, zatímco postižená kost se zvětšuje normálně, čímž se „zamaskuje“ dříve prominující exostotický výběžek (Solomon 1961 in Hennekam 1991).

Větší exostózy mohou být hmatatelné či viditelné pouhým okem jako boulička, malé exostózy jsou pozorovatelné radiograficky. Typicky jsou tyto výrůstky přítomny v epifyzárních oblastech dlouhých kostí a po uzávěru epifýz postupně tyto zprvu chrupavčité výrůstky enchondrálně osifikují v kostní tkáň a jejich růst se zastavuje (Solomon 1964 in Wuyts et al. 1998). Pokračující růst a osifikace exostóz způsobují tloušťnutí metafyzárních oblastí dlouhých kostí a zpomalují růst kosti (Hennekam 1991; Pannier and Legeai-Mallet 2008; Wuyts et al. 1996), což vede ke skeletálním deformitám, jako je zkrácení a vyboulení předloktí, či menší a občas mírně disproporční postavě (Cook et al. 1993). Kromě komplikací způsobených utlačováním okolní tkáně (především periferní nervy a velké cévy, vzácně i mícha) těmito výrůstky a způsobujících bolest a poruchy krevní cirkulace (Hennekam 1991), mají pacienti s exostózami celkově poruchy (re)modelace kostí a především též zvýšené riziko maligní transformace v chondrosarkom (vzácně i osteosarkom), který se může vyvinout právě z přítomných exostóz. Maligní transformace však byla pozorována asi jen u 2-5 % pacientů (Solomon 1964 in Wuyts et al. 1998) a mezi její prvotní příznaky patří náhlý nárůst velikosti, bolest a někdy neurologické symptomy (Hennekam 1991). Důležité je si uvědomit, že u naprosté většiny pacientů jsou exostózy asymptomatické a zasahují do obecného zdraví jen velmi málo (Hennekam 1991). Při absenci klinického problému nevyžaduje exostózová choroba žádnou terapii. Ze zdravotních či kosmetických důvodů mohou být exostózy odstraněny chirurgicky (Hennekam 1991).

Exostózy jsou geneticky velmi heterogenní onemocnění a jako primární příčina jejich tvorby se jeví mutace v genech kontrolujících proliferaci a diferenciaci chondroblastů, čímž dochází k abnormálnímu vývoji chrupavčité tkáně (Hennekam 1991). Dosud byly identifikovány tři geny: *EXT1* v chromozomové oblasti 8q23-q24 (Ahn et al. 1995), *EXT2* v chromozomové oblasti 11p11-p12 (Wu et al. 1994; Stickens et al. 1996) a *EXT3* na krátkém raménku chromozomu 19 (Lemerrer et al. 1994), přičemž homologní jsou pouze geny *EXT1* a *EXT2*, a to především na svých 3' karboxy koncích (Wuyts et al. 1996). Přestože je homologie na proteinové úrovni značná, nebyly v této oblasti nalezeny žádné konzervované funkční domény (Wuyts et al. 1996). Mutace v těchto dvou genech také zodpovídají za naprostou většinu případů pacientů s exostózami, zatímco *EXT3* pravděpodobně reprezentuje minoritní lokus (Cook et al. 1993; Wuyts et al. 1998). Zajímavé ovšem je, že v evropské a americké populaci je frekvence mutací u pacientů s exostózami mírně vyšší v genu *EXT1* než v genu *EXT2* (Jennes et al. 2012), ovšem u asijské populace byl zjištěn opačný výsledek: v případech exostóz frekvenčně mírně dominují mutace v genu *EXT2* (Xu et al. 1999).

Nabízí se otázka, zda existují nějaké genotypo-fenotypové korelace v závislosti na různém typu mutací a zdali existují fenotypové rozdíly mezi pacienty s exostózami typu I způsobené mutací v genu *EXT1* a pacienty s exostózami typu II způsobené mutací v genu *EXT2*. Několik studií naznačovalo závažnější fenotyp u pacientů s mutací v genu *EXT1* ve srovnání s pacienty s mutací v genu *EXT2* či pacienty s exostózami bez prokázané mutace v *EXT* genech (Alvarez et al. 2007 in Jennes et al. 2012; Porter et al. 2004 in Jennes et al. 2012), zatímco naopak jiné studie vyvracejí takovéto korelace u svých pozorování (Signori et al. 2007 in Jennes et al. 2012; Jennes et al. 2008 in Jennes et al. 2012). Takový rozpor není

nic neočekávaného, neboť exostózy jsou i tak velmi heterogenní a vykazují velkou klinickou inter- a intrafamiliární fenotypovou variabilitu (Wuyts and Van Hul 2000).

V této diplomové práci se budeme dále věnovat pouze genu *EXT1*, neboť leží v téže chromozomové oblasti jako gen *TRPS1* a jeho delece je asociována s TRPS II.

1.5 Gen *EXT1*

1.5.1 Lokalizace

Gen *EXT1* (Exostosin glycosyltransferase 1) (Gene ID #2131) se nachází v chromozomové oblasti 8q24.1 (Ahn et al. 1995), distálně od genu *TRPS1*.

1.5.2 Struktura

Gen *EXT1* se skládá z 11 exonů (Obr. 8), které svou délkou varírují mezi 90 a 1735 bp. Největší je přitom první exon se svou délkou 1735 bp. Celý gen pak zahrnuje přibližně 350 kb genomické DNA (Ludecke et al. 1997).



Obr. 8: Schematické znázornění struktury genu *EXT1* – černé boxy představují kódující oblasti. První polovina prvního exonu znázorněná bílou barvou představuje 5'-UTR nepřekládanou oblast, analogicky bílá část 11. exonu představuje 3'-UTR. Exony jsou číslovány na základě genomické struktury zjištěné skupinou Lüdecke et al. 1997. Obrázek převzat z publikace Wuyts et al. 1998.

Promotor genu *EXT1* („*EXT1* core promoter“) byl zamapován přibližně -917 bp *upstream* od translačního iniciačního kodonu, uvnitř 123 bp oblasti (-972-850). Tento region je u savců konzervován a je lokalizován v CpG ostrůvcích obsahujících CAAT a GC boxy, avšak žádný TATA box. Takovýto promotor je charakteristický pro tzv. „housekeeping“ („udržovací“) geny (Larsen et al. 1992 in Lüdecke et al. 1997), což je v souladu se zjištěnou všudypřítomnou expresí tohoto genu (Lüdecke et al. 1997).

Bylo zjištěno, že na pozici -1158 se může nacházet polymorfní G/C-SNP (rs34016643), lokalizovaný ve vazebném místě pro transkripční faktor v těsné blízkosti promotoru *EXT1*. Genotypo-fenotypové studie naznačily asociaci C-alely s nižší postavou, ale také s menším počtem exostóz. Polymorfismy jako je právě tento jsou schopné fungovat jako genetické modifikátory, zvláště pokud jsou lokalizované uvnitř TFBS („Transcription factor binding site“) v promotorové oblasti, čímž mohou ovlivnit hladinu genové exprese (Kramer et al. 2008 in Jennes 2011). Bylo prokázáno, že nalezený SNP lokalizovaný v těsné blízkosti core promotoru má signifikantní efekt na *EXT1* promotorovou aktivitu, což u C-alely vede k nárůstu promotorové aktivity o 56 % ve srovnání s G-alelou. Mohlo by se tedy jednat o potenciální regulační SNP, který by mohl fungovat jako jakýsi modifikátor, což by mohlo vysvětlit část klinické různorodosti pozorované u pacientů s exostózami (Jennes et al. 2012).

1.5.3 Exprese

Gen *EXT1* kóduje mRNA o velikosti 3376 bp (dle NCBI), která je následně translatována do proteinu o velikosti 746 aminokyselin (Ahn et al. 1995). Protein kódovaný genem *EXT1* je transmembránový glykoprotein typu II, což znamená, že se skládá z N-terminálního cytoplazmatického konce, transmembránové domény, stopky a velké globulární domény, která je pravděpodobně nositelem enzymatické aktivity (Colley 1997 in McCormick et al. 2000). Protein EXT1 vykazuje glykozyltransferázovou aktivitu, je lokalizován v endoplazmatickém retikulu a působí při polymerizaci heparan sulfátu (McCormick et al. 1998).

Gen *EXT1* je exprimován ve všech tkáních, přesto byla nalezena nejvyšší hladina exprese hlavně v maturujících chondrocytech, ve kterých mohou proteiny EXT formovat komplexy, aby zajistily fyziologický vývoj chrupavky. Složky ECM (jako např. chondroitin sulfát či heparan sulfát) ustanovují jakési „mikroprostředí“ v chrupavce i kosti, kde je mj. uloženo mnoho různých růstových faktorů, které jsou důležité pro správné biologické působení. Je možné, že pozměněná produkce proteoglykanů v kostní či chrupavčité matrix naruší lokální působení těchto růstových faktorů a negativně tak ovlivní normální chondrogenezi ve vyvíjející se kosti. Bylo by tedy zajímavé spekulovat, zda pozměněná kostní matrix z důvodu snížené produkce heparan sulfátu u pacientů s HME není schopna „zachytit“ růstové faktory (jako např. Indian Hedgehog), což by mohlo vést k abnormálnímu vývoji kostní tkáně s následným vznikem exostóz (Kobayashi et al. 2000).

1.5.4 Funkce

Studie sporadických a z exostóz vzniklých chondrosarkomů přinesly zjištění, že gen *EXT1* má tumorsupresivní funkci (Ahn et al. 1995). Náhled na podrobnější fungování genu *EXT1* přinesla data získaná ze studií McCormick (1998) a Lind (1998). Tyto práce odhalily, že protein EXT1 je ve skutečnosti transmembránový glykoprotein lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu vykazující glykozyltransferázovou aktivitu a katalyzující biosyntézu glykosaminoglykanu, heparan sulfátu (HS)⁵ (McCormick et al. 1998). Konkrétně tento protein figuruje v kroku elongace řetězce, mohli bychom ho tedy pojmenovat jako HS-polymerázu (Lind et al. 1998).

Zdá se, že protein EXT1 se svým homologním proteinem EXT2 formují *in vivo* hetero-oligomerní komplexy, což vede k akumulaci obou proteinů v Golgiho aparátu. Tento

⁵ Heparan sulfát je komplexní lineární polysacharid (proteoglykan), který je všudypřítomně distribuován na površích buněk a v extracelulární matrix. Sestává ze sulfátovaných glykosaminoglykanových řetězců, které jsou kovalentně vázány k různým core proteinům. Biosyntéza HS řetězců zahrnuje formování iniciačního, jednoduchého polysacharidu, složeného ze střídající se kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminových podjednotek spojených 1→4 vazbou. Vysoce modifikovaná sacharidová sekvence má schopnost interagovat se škálou biologických faktorů. Je také známo, že HS je zahrnut v mnoha buněčných procesech od buněčné proliferace, přes signalizaci růstových faktorů až po buněčnou adhezi (Carey 1997 in Wuyts and Van Hul 2000) a pravděpodobně tak zastává důležitou roli v kontrole kostního růstu (Lind et al. 1998).

EXT1/EXT2 komplex navíc vykazuje podstatně vyšší glykozylntransferázovou aktivitu než proteiny EXT1 či EXT2 samotné, což naznačuje, že tento komplex reprezentuje biologicky relevantní formu enzymů. Oba proteiny EXT jsou tedy vyžadovány pro plně aktivní enzymatický komplex, což znamená, že tyto dva proteiny se nemohou vzájemně zastupovat ve své funkci. Toto poznání přináší logické vysvětlení, jak mohou mutace v jednom z těchto dvou EXT genů vyústit ve stejný fenotyp (McCormick et al. 2000).

Role genu *EXT1* ve formování exostóz na molekulární úrovni byla objasněna identifikací homologu genu *EXT1* u drozofily („Tout-velu gene“). Tento gen je, zdá se, vyžadován pro vlastní správnou difúzi signálního proteinu „Hedgehog“ (Hh) (Bellaiche et al. 1998). Je přitom známo, že protein „Indian Hedgehog“ (Ihh), jeden ze savčích homologů proteinu Hh, je známým regulátorem proliferace a diferenciaci chondrocytů v růstové chrupavce; je exprimován pre-hypertrofickými chondrocyty, difúzí proniká do perichondria (vazivový obal chrupavky), kde pozitivně reguluje PTHrP (Parathyroid hormone-related protein). PTHrP poté dává signál na PTH/PTHrP receptor pre-hypertrofických buněk a zabraňuje tak pohybu dalších chondrocytů níže do diferenciacní dráhy. Když se chondrocyty stanou zcela hypertrofické, vypnou expresi Ihh, což dovoluje novým buňkám zahájit diferenciacní dráhu (Vortkamp et al. 1996 in Wuyts and Van Hul 2000). Tím se nabízí i model pro vysvětlení vzniku a vývoje exostóz: proteiny EXT jakožto glykozylntransferázy jsou zahrnuté v syntéze glykózaminoglykanu, který reguluje difúzi proteinu Ihh. Mutací v jednom z těchto genů *EXT* se tvoří nefunkční proteiny, které zabraňují difúzi proteinu Ihh, čímž porušují negativní zpětnovazebnou smyčku řídicí diferenciaci chondrocytů. To následně vede k poruše skeletálního vývoje, jak je pozorováno u exostózové choroby (Wuyts and Van Hul 2000).

1.5.5 Mutace

Gen *EXT1* je genem tumorsupresorovým. Mutace tohoto genu se dědí autozomálně dominantně; z důvodu autozomálně dominantní formy dědičnosti mají postižení jedinci 50% riziko přenosu choroby na své potomky.

Knudson (1971) postuloval klasické paradigma, které říká, že autozomálně dominantní vzorec dědičnosti u rakovinných syndromů odráží autozomálně recesivní ztrátovou („loss-of-function“) mutaci na buněčné úrovni (Knudson 1971). To znamená, že aby se udál onkogenetický efekt, je nezbytné, aby obě kopie genu, který normálně funguje jako tumorsupresorový, byly odstraněny. Jinak řečeno, mutace v tumorsupresorových genech mají recesivní charakter, což znamená, že aby se „normální“ geny staly tumorigenními, musí být mutovány obě jejich alely. U familiárních dominantně děděných rakovinných syndromů je mutace v první alele zděděna (mutace v germinální linii rodičů) a druhá mutace je somaticky získána (somatická inaktivace u potomka). U sporadických, tedy nedědičných, forem jsou obě mutace somatické, získané (Knudson 1971). Za některých okolností však může hemizygotní stav tumorsupresorového genu (např. geny *APC* či *NF1/NF2*) vést k benigním tumorům (např. adenomy či neurofibromy), tzn. že i ztráta pouze jediné kopie určitého tumorsupresorového genu může vést k jasnému fenotypu. Následná

další ztráta druhé alely, ztráta dalších jiných tumorsupresorových genů a/nebo aktivace onkogenů následně vede k maligní transformaci – ke kolorektálnímu adenokarcinomu či neurofibrosarkomu. Analogický model bude pravděpodobně platit i v případě genu *EXT1*: vrozená ztrátová („loss-of-function“) mutace v genu *EXT1* může vést k mnohočetným exostózám, zatímco další ztráta druhé alely či ztráta dalšího tumorsupresorového genu v kombinaci s aktivací onkogenů může vést k maligní transformaci exostóz v chondrosarkom či osteosarkom (Wuyts et al. 1996). To by mohlo vysvětlovat i vyšší prevalenci chondrosarkomů u exostózové choroby (tedy 2-5%) ve srovnání s incidencí 1/100 000 pro všechny druhy kostních rakovin (Hecht et al. 1995). Domněnka tumorsupresorové funkce genu je podpořena zjištěním, že buňky chondrosarkomů a osteosarkomů vykazují ztrátu heterozygoty („loss of heterozygosity“, LOH) v obou alelách *EXT1* na chromozomu 8 (či alelách *EXT2* na chromozomech 11, popř. kombinací alel *EXT* genů) (Hecht et al. 1995; Raskind et al. 1995), dále faktem, že chondrosarkomy existují jak v dědičné tak nedědičné formě (přičemž většina chondrosarkomů je sporadických) a také skutečností, že pacienti s exostózami mají zvýšené riziko vývinu chondrosarkomů (Raskind et al. 1995).

Většina mutací v genu *EXT1* jsou delece, *nonsense* mutace, sestřihové („splice-site“) mutace či mutace posunující čtecí rámec („frame-shift“), které vedou k předčasné terminaci syntézy proteinu (Wuyts and Van Hul 2000). Tyto zkrácené proteiny *EXT1* jsou pravděpodobně inaktivní a jsou rychle degradovány, což vede k téměř kompletní ztrátě funkce. Naproti tomu *missense* mutace jsou poměrně vzácné.

Skupina Wuyts et al. (1998) provedla studii typů mutací i četnosti mutací v jednotlivých exonech. Zjistila, že většina mutací je „osobních“, tedy přítomných pouze v jedné rodině. Analýza distribuce mutací v kódujícím regionu genu *EXT1* odhalila, že terminální část genu *EXT1* obsahuje mnohem méně mutací, než by se očekávalo a že většina mutací je situována do prvních šesti exonů. Zajímavé také je, že terminální region vykazuje největší stupeň konzervace mezi členy genové rodiny *EXT* (Wuyts et al. 1998). Je možné, že mutace v terminálním regionu, které způsobují předčasné ukončení translace, vedou k tvorbě proteinů, které jsou méně zkrácené a tudíž mohou stále mít nějakou funkční kapacitu. Lidé s takovými mutacemi na terminálním konci mohou tudíž vykazovat extrémně mírný fenotyp či být dokonce asymptomatictí (Wuyts and Van Hul 2000).

Bodová mutace či menší delece v genu *EXT1* je spojována s klasickým fenotypem, tedy s výskytem mnohočetných izolovaných exostóz typu I. U pacientů s větší delecí zahrnující gen *EXT1* i gen *TRPS1* nalézáme exostózy v kombinaci typickými projevy TRPS (viz kap. 1.1.3) a hovoříme o tzv. Langer-Giedionovu syndromu, syndromu přilehlých genů.

2. Předpoklady a cíle diplomové práce

Při koncipování této práce vycházíme z předpokladů, že

- trichorhinofalangeální syndrom vzniká v důsledku strukturní nebo bodové mutace v genu *TRPS1*;
- jeho forma TRPS II je syndromem přilehlých genů způsobeným rozsáhlejší heterozygotní delecí v chromozomové oblasti 8q24, přičemž delece zahrnuje minimálně geny *TRPS1* a *EXT1*;
- exostózová choroba se může rozvinout jako následek mutací genu *EXT1* nebo homologního genu *EXT2*

Cílem práce je prověřit platnost uvedených předpokladů při aplikaci na konkrétní soubor pacientů, tedy detekovat strukturní a bodové mutace v kódujících sekvencích genu *TRPS1* u pacientů trpících trichorhinofalangeálním syndromem, detekovat strukturní změny v genu *EXT1* u pacientů s izolovanými exostózami a posoudit klinický význam nalezených mutací.

Pro splnění tohoto cíle budou využity následující prostředky:

- chromozomová oblast 8q24 všech pacientů bude vyšetřena metodou MLPA pro detekci rozsáhlejších delecí a duplikací;
- kódující exony genu *TRPS1* pacientů s trichorhinofalangeálním syndromem budou podrobeny mutační analýze pro detekci drobných strukturních změn a bodových mutací;
- nalezené mutace budou zhodnoceny za využití dostupných databází mutací a polymorfismů a relevantních publikací

3. Materiál

Zpracovávaným materiálem byla lidská DNA izolovaná z periferní žilní krve odebrané do zkumavky s antikoagulační úpravou EDTA. Vzorky krve byly odebrány pacientům indikovaným ke genetickému vyšetření z důvodu podezření na mutaci genů *TRPS1* či *EXT1*.

Vzorky periferní žilní krve či již vyizolovaná DNA pacientů s TRPS či izolovanými exostózami byly získávány na základě spolupráce s genetickou ambulancí MUDr. Miloslava Kuklíka, CSc. a s doc. MUDr. Alicí Baxovou, CSc. z Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN.

Do diplomové práce bylo pro molekulárně genetickou analýzu zahrnuto celkem 16 pacientů, z toho bylo 8 pacientů s typickým fenotypem TRPS a 8 pacientů vykazovalo pouze exostózovou chorobu (v souboru pacientů s exostózami byli dva pacienti příbuzní, jednalo se o matku a dceru). Všichni byli diagnostikováni na základě charakteristických faciálních znaků, obecných symptomů daných onemocnění a hodnocení RTG snímků. Až na jednoho pacienta (pacient č. 9) byli všichni bez nálezu po klasické FISH či CGH. Metody FISH a CGH však mají svou určitou limitní hranici detekovatelnosti a nejsou tak schopny zachytit menší aberace, jakými jsou např. delece jednotlivých exonů genu menší než 5-10 Mb (Forozan et al. 1997). Pacient p9 měl již potvrzenou rozsáhlou heterozygotní delecí na chromozomu 8q.

Od 6 pacientů jsme měli k dispozici úplnou periferní žilní krev, u zbylých 10 již izolovanou DNA. Ve vyšetřovaném souboru bylo celkem 10 žen a 6 mužů ve věku od 8 do 60 let.

Každý vzorek dostal své evidenční číslo od p1 (pacient 1) do p16 (pacient 16) a pod tímto číslem bylo se vzorkem dále pracováno jak v laboratoři, tak při závěrečném hodnocení.

4. Metody

4.1 Izolace DNA

4.1.1 Charakterizace metody

DNA může být z buněk vyizolována za pomoci mnoha různých metod. Jednu z těchto metod představuje izolace DNA za pomoci komerčního extrakčního kitu. Jedná se o tzv. „kolonkovou“ metodu izolace DNA. Tento druh představuje jednoduchý a rychlý způsob izolace DNA s velmi dobrou výtěžností. Výsledkem je DNA vysoké kvality a čistoty bez kontaminace a s kompletním odstraněním inhibitorů (www.qiagen.com). Pro naši analýzu jsme využili právě tento způsob „kolonkové“ izolace s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kitu, založený na přítomnosti silikátové membrány natažené ve zkumavce; optimalizované složení pufrů a enzymy lyzují vzorek, stabilizují nukleové kyseliny a posilují specifické navázání DNA na silikagelovou membránu, zatímco kontaminační látky jí projdou. Inhibitory PCR (jako např. dvojmocné kationy a proteiny) jsou kompletně odstraněny ve dvou promývacích krocích. Zanechaná čistá DNA je následně promyta buď vodou či pufrém dodaným s kitem. Tento QIAamp DNA Blood Mini Kit je designován na zpracování až 200 µl čerstvé či zmrazené lidské plné krve (www.qiagen.com).

4.1.2 Pracovní protokol

Periferní žilní krev pacientů s TRPS či izolovanými exostózami byla na odborných pracovištích odebrána do zkumavky s antikoagulační úpravou – EDTA. Tato krev byla uchovávána zamrazena až do doby zpracování.

DNA byla izolována z plné periferní krve užitím izolačního kitu QIAamp® DNA Blood Mini Kit od společnosti QIAGEN s použitím následujících chemikálií:

QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Německo

- roztok QIAGEN proteázy
- pufr AL („Buffer AL“)
- pufr AW1 („Buffer AW1“)
- pufr AW2 („Buffer AW2“)

Destilovaná voda ze systému MILLIPOR Gradient; Milli-Q
Etanol 96%, P-LAB a.s., Praha

Použité přístroje:

- stolní vortex: VORTEX-GENIE®2 (spol. Scientific Industries, SI™)
- termoblok: Digitální blokové lázně Grant QBD (spol. LABOSERV s.r.o.)
- malá příruční centrifuga: Combi-Spin FVL-2400N (spol. BIOSAN)
- centrifuga: MICRO 240A (spol. Denville SCIENTIFIC INC.)

Zkumavky se zamraženou periferní krví byly vyndány z mrazáku a nechány při laboratorní teplotě až do úplného roztátí. Poté byla krev zpracována za účelem izolace DNA dle následujícího protokolu od výše jmenované společnosti:

1. Napipetovali jsme 20 μ l QIAGEN proteázy na dno 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek.
2. Do každé mikrozkumavky jsme přidali 200 μ l vzorku (tj. periferní krve).
3. Následně jsme přidali 200 μ l pufru AL („Buffer AL“) a vortexovali po dobu 15 s.
4. Takto připravené vzorky jsme inkubovali 10 minut na ploténce vyhřívané na 56°C.
5. Poté jsme krátce centrifugovali na malé příruční centrifuze, abychom odstranili kapičky z víčka.
6. Do každého vzorku jsme přidali 200 μ l 96% etanolu, vortexovali 15 s, následně jsme opět krátce centrifugovali.
7. Takto připravený vzorek z předchozího kroku jsme opatrně přenesli na kolonku („QIAamp spin column“, součást izolačního kitu) umístěnou ve 2ml sběrné zkumavce a centrifugovali při 8 000 rpm (6 000 \times g) po dobu 1 minuty.
8. Filtrát zachycený ve zkumavce jsme vyhodili a kolonku usadili do čisté 2ml sběrné zkumavky a přidali 500 μ l pufru AW1 („Buffer AW1“). Následně jsme centrifugovali při 8 000 rpm po dobu 1 minuty.
9. Filtrát zachycený ve zkumavce jsme opět vyhodili a kolonku umístili do nové, čisté 2ml sběrné zkumavky a přidali 500 μ l pufru AW2 („Buffer AW2“). Následně jsme centrifugovali na plnou rychlost 14 000 rpm (20 000 \times g) po dobu 3 minut.
10. Filtrát ve sběrné zkumavce jsme vyhodili a kolonku přendali do nové, čisté 1,5ml centrifugační sběrné mikrozkumavky a na kolonku jsme připipetovali 200 μ l destilované vody. Inkubovali jsme při laboratorní teplotě po dobu 5 minut (což zvyšuje výtěžek DNA). Následně jsme centrifugovali při 8 000 rpm po dobu 1 minuty.
11. Takto připravenou vyizolovanou DNA (tedy filtrát z předchozího kroku) jsme uchovávali v lednici při 4 °C.

4.2 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Metoda MLPA byla použita jako výchozí metoda k základnímu vyšetření DNA všech pacientů s TRPS i EXT. K vyšetření byl použit SALSA MLPA P228-B1 TRPS1-EXT1 probemix kit od firmy MRC-Holland, Amsterdam, Nizozemí.

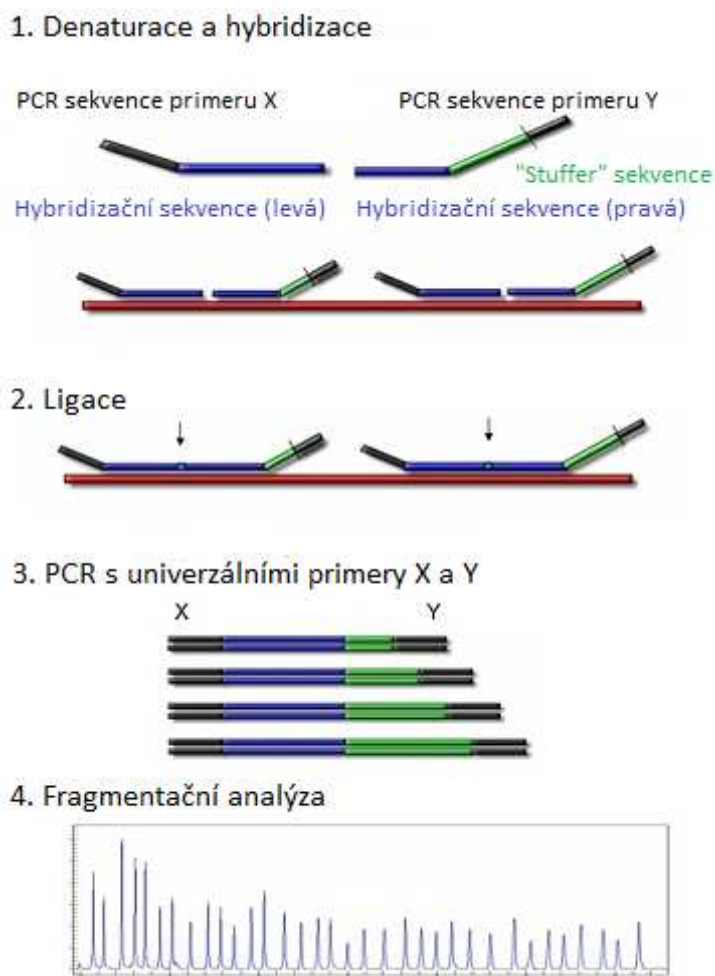
4.2.1 Charakterizace metody

„Multiplex ligation-dependent probe amplification“ (MLPA) je metoda molekulární genetiky, která byla poprvé popsána v roce 2002 skupinou Schouten et al. Spojuje v sobě dva různé druhy metod molekulární genetiky - polymerázovou řetězovou reakci („Polymerase Chain Reaction“, PCR) a hybridizační metody (např. „Fluorescent *In Situ* Hybridisation“, FISH;

a od ní odvozené) – čímž se tato metoda stává specifická, robustní a celkem snadno proveditelná v jediné zkumavce.

Analýzu MLPA můžeme rozdělit do několika stěžejních kroků (Obr. 9). Nejdříve se provede denaturace vyšetřované DNA, následně je tato denaturovaná DNA inkubována 16-20 hodin se směsí sond; každá sonda se skládá ze dvou oddělených částí: první část sondy sestává ze dvou úseků – z hybridizační sekvence (20 – 30 nukleotidů) komplementární k danému cílovému místu na vyšetřované DNA a ze sekvence pro přímý primer, druhá část sondy sestává ze tří úseků – z hybridizační sekvence (25 – 43 nukleotidů) komplementární k danému cílovému místu na vyšetřované DNA, dále z tzv. „stuffer“ neboli „vycpávkové“ sekvence a zpětného primeru. Sondy komplementární k odlišným lokusům obsahují různě dlouhé „stuffer“ sekvence. Obě části každé sondy nasednou na cílovou DNA těsně vedle sebe dle pravidla komplementarity. Dále následuje ligace; pomocí enzymu ligázy se doplní kovalentní vazba a obě části sondy se tak spojí. Poté se nechá proběhnout denaturace a sondy se systémem PCR amplifikují. Následně se amplifikáty elektroforeticky dělí dle své rozdílné délky, variabilní délka je způsobena právě přítomností různě dlouhé „vycpávkové“ sekvence pro každý pár sond. Posledním krokem je pak počítačová analýza dat (tedy fragmentů), která nám ukáže, jak je vyšetřované místo v genomu zastoupeno (Schouten et al. 2002).

Pro tuto metodu je tedy typické, že nejsou amplifikovány cílové sekvence DNA, nýbrž sondy, které na cílovou sekvenci nasedají a hybridizují s ní. Pokud je tedy v DNA daný gen přítomen, vytvoří se amplikon sond a výsledek je zaznamenán na kapilární elektroforéze. Pokud je však cílový lokus deletován, části sondy nemohou nasednout, být zligovány, a tudíž ani amplifikovány. Dále (v porovnání např. se standardní multiplex PCR) se při MLPA reakci používá jen jeden pár primerů (Schouten et al. 2002).



Obr. 9: Princip metody MLPA – 1: Sondy – levá sonda sestává z hybridizační sekvence a primeru X, pravá sonda sestává z hybridizační sekvence, tzv. „Stuffer“ sekvence a primeru Y. Pro každý pár sondy je „Stuffer“ sekvence různě dlouhá. Denaturace DNA a následná nasednutí (hybridizace) sond na cílové sekvence na principu komplementarity; 2: Ligace sond; 3: Amplifikace sond (nikoliv DNA) systémem PCR; 4: Počítačová analýza fragmentů (www.mlpa.com).

Tradiční metody detekce mutací, které jsou založené na amplifikaci jednotlivých exonů z genomické DNA, nemohou detekovat většinu exonových delecí a duplikací, pokud je též přítomna normální alela. Právě metoda MLPA je vhodná pro detekci heterozygotních delecí a duplikací jednotlivých exonů, dají se však detekovat i bodové mutace (SNP) či hodnotit aneuploidie (Schouten et al. 2002). Zásadní nevýhodou však zůstává, že jejím prostřednictvím nelze vypátrat balancované translokace; tato metoda nám pouze ukáže, zda-li (a případně kolikrát) je daný úsek v genomu přítomen, ale nikoli, zda je přítomen na správném místě (Rooms et al. 2005).

Konkrétně byl pro naši práci použit kit SALSA MLPA EK1 se sadou sond SALSA MLPA P228-B1 TRPS1-EXT1 od firmy MRC-Holland, Amsterdam, Nizozemí. Schématické složení směsi těchto sond je uvedeno v tabulce 2, předhledné shrnutí vyšetřované chromozomé oblasti 8q24 pak v tabulce 3. Výsledné amplifikáty mají rozdílnou délku pohybující se od 130 do 463 nt a na základě rozdílné délky mohou být rozděleny elektroforeticky. Srovnáním a

vyhodnocením profilu píků získaného z vyšetřovaného vzorku vůči profilu píků referenčního vzorku (tedy zdravé, patologický fenotyp nevykazující, osoby) indikujeme aberantní oblasti.

Tab.2: Schématické znázornění směsi sond SALSA MLPA P228-B1 TRPS1-EXT1 použitých pro základní vyšetření všech pacientů. První sloupec označuje délku vznikajících fragmentů (nt), ve druhém sloupci je zapsán kód (komerční označení) vlastní sondy, třetí sloupec obsahuje název daného vyšetřovaného úseku (tj. genu a jeho konkrétní oblasti) a čtvrtý sloupec popisuje jejich chromozomovou lokalizaci. Růžově a červeně vyznačeny geny našeho zájmu a jejich vyšetřované exony, modře znázorněny příslušné kontrolní oblasti vybraných chromozomů, kam nasedají referenční sondy.

délka vznikajících fragmentů (nt)	komerční název sondy	název genu a případně oblast, kam sonda nasedá	chromozomová lokalizace
130	03896-L00020	referenční	11q13
136	08271-L08150	MTBP	8q24
142	07683-L09170	TNFRSF11B	8q24
147	13226-L14559	referenční	1p21
154	00580-L00145	MYC	8q24
160	08277-L08156	CSMD3	8q24
172	12943-L14461	referenční	12p11
178	06830-L06424	EXT1 exon 8	8q24
184	14330-L15999	referenční	2q32
193	07373-L07020	TRPS1 exon 4	8q24
202	09910-L27245	CSMD3	8q24
211	07376-L07023	TRPS1 exon 6	8q24
217	04208-L09172	MTSS1	8q24
224	07371-L07405	TRPS1 exon 3	8q24
231	14934-L16667	referenční	6q22
238	00853-L01381	SAMD12	8q24
246	07378-L07025	TRPS1 exon 7	8q24
256	07372-L07019	TRPS1 exon 4	8q24
265	07370-L07406	TRPS1 exon 3	8q24
274	06824-L06418	EXT1 exon 2	8q24
279	14870-L20910	MYC	8q24
285	07368-L26563	TRPS1 exon 1	8q24
292	06822-L06416	EXT1 exon 1	8q24
301	01041-L09956	ASAP1	8q24
310	03379-L02772	referenční	5q33
321	08270-L08149	EBAG9	8q24
333	07374-L27243	TRPS1 exon 5	8q24
338	09015-L27244	RNF139	8q24
346	03080-L02480	EXT1 exon 11	8q24
355	07377-L07408	TRPS1 exon 7	8q24
364	07369-L07409	TRPS1 exon 2	8q24
373	09490-L09747	TRIB1	8q24
388	05218-L04587	EIF3E	8q24
394	17630-L21674	KIAA0196	
411	03081-L27292	TRPS1 exon 1	8q24
418	01048-L27291	RNF139	8q24
424	17938-L27425	referenční	18q21
430	17632-L27290	RAD21	8q24
436	08273-L27289	NOV	8q24
445	08276-L08155	CSMD3	8q24
454	08274-L08153	HAS2	8q24
462	18948-L01619	referenční	13q13
472	13813-L15307	referenční	3q25
483	13439-L14894	referenční	17p13
492	18547-L24044	referenční	9q34

Tab.3: Schématické souhrnné znázornění oblasti 8q24 vyšetřované metodou MLPA – první sloupec znázorňuje délku vznikajících fragmentů, druhý sloupec označuje komerční název sondy nasedající na vyšetřovaný úsek, třetí sloupec obsahuje název daného vyšetřovaného úseku (tj. genu a jeho konkrétní oblasti) a čtvrtý sloupec popisuje jejich chromozomovou lokalizaci, tedy pruh 8q24. Růžově a červeně vyznačeny geny našeho zájmu a jejich vyšetřované exony.

délka vznikajících fragmentů (nt)	komerční název sondy	název genu a oblast, kam sonda nasedá	chromozomová lokalizace
301	01041-L09956	ASAP1 exon 28	8q24
154	00580-L00145	MYC exon 3	8q24
279	14870-L20910	MYC exon 1	8q24
373	09490-L09747	TRIB1 exon 3	8q24
394	17630-L21674	KIAA0196 exon 2	8q24
217	04208-L09172	MTSS1 exon 7	8q24
418	01048-L27291	RNF139 exon 2	8q24
338	09015-L27244	RNF139 exon 1	8q24
454	08274-L08153	HAS2 exon 4	8q24
136	08271-L08150	MTBP exon 16	8q24
436	08273-L27289	NOV exon 1	8q24
142	07683-L09170	TNFRSF11B exon 4	8q24
238	00853-L01381	SAMD12 upstream	8q24
292	06822-L06416	EXT1 exon 1	8q24
274	06824-L06418	EXT1 exon 2	8q24
178	06830-L06424	EXT1 exon 8	8q24
346	03080-L02480	EXT1 exon 11	8q24
430	17632-L27290	RAD21 exon 10	8q24
285	07368-L26563	TRPS1 exon 1	8q24
411	03081-L27292	TRPS1 exon 1	8q24
364	07369-L07409	TRPS1 exon 2	8q24
265	07370-L07406	TRPS1 exon 3	8q24
224	07371-L07405	TRPS1 exon 3	8q24
256	07372-L07019	TRPS1 exon 4	8q24
193	07373-L07020	TRPS1 exon 4	8q24
333	07374-L27243	TRPS1 exon 5	8q24
211	07376-L07023	TRPS1 exon 6	8q24
355	07377-L07408	TRPS1 exon 7	8q24
246	07378-L07025	TRPS1 exon 7	8q24
445	08276-L08155	CSMD3 exon 1	8q24
160	08277-L08156	CSMD3 exon 10	8q24
202	09910-L27245	CSMD3 exon 53	8q24
321	08270-L08149	EBAG9 exon 4	8q24
388	05218-L04587	EIF3E exon 3	8q24

4.2.2 Pracovní protokol

Na spektrofotometru jsme změřili koncentraci námi vyizolované DNA. Pro MLPA analýzu potřebujeme roztok DNA o objemu 2,5 µl obsahující cca 30 ng DNA. To znamená, že v 1 µl musí být 12 ng DNA. Proto jsme si museli spočítat, kolik námi vyizolované DNA máme napipetovat do reakce. Následně tento objem musíme doplnit dH₂O na konečný objem 2,5 µl. U některých vzorků bylo použito menší než doporučené množství DNA z důvodu nízké koncentrace DNA. I v těchto případech ovšem bylo použité množství dostačující, což potvrzují i naše předchozí zkušenosti s metodou MLPA.

Pro analýzu byl použit výše zmíněný SALSA MLPA Kit od firmy MRC-Holland, Amsterdam, Nizozemí. Všechny fáze MLPA (denaturace DNA, hybridizace sond, ligace sond a amplifikace ligovaných sond) probíhaly v thermocyleru s vyhříváním víkem. Reakční chemikálie byly vždy před použitím krátce vortexovány (kromě enzymů). Při přípravě master mixů byl enzym přidáván vždy nakonec a jen lehce promíchán pipetou. Oproti původnímu protokolu byla MLPA analýza prováděna v polovičních objemech, fragmentační analýza pak v plném objemu dle původního protokolu.

Teplotní profil thermocyleru pro MLPA reakci:

1) Denaturace DNA

1. 98°C 5 minut
2. 25°C pauza

2) Hybridizační reakce

3. 95°C 1 minuta
4. 60°C pauza

3) Ligační reakce

5. 54°C pauza
6. 54°C 15 minut
7. 98°C 5 minut
8. 20°C pauza

4) PCR

9. 35 cyklů
 - 95°C 30 sekund
 - 60°C 30 sekund
 - 72°C 60 sekund
10. 72°C 20 minut
11. 4°C pauza

Použité chemikálie

SALSA® MLPA® Kit, MRC-Holland, Nizozemí

- Pufr („SALSA MLPA Buffer“)
- ligační pufru A („Ligase buffer A“)

- ligační pufru B („Ligase buffer B“)
- ligáza („SALSA Ligase-65 enzyme“)
- primery („SALSA PCR Primer mix“) – syntetické oligonukleotidy, jeden z nich je fluorescenčně značen, dNTPs
- polymeráza („SALSA polymerase“)

Směs oligonukleotidových sond (Probemix)

Destilovaná voda ze systému MILLIPOR Gradient; Milli-Q

Formamid

LIZ 500

Použité laboratorní přístroje

- spektrofotometr: Nanophotometer (spol. IMPLEN)
- laminární flowbox: s@feFlow1.2 (spol. BIOAIR Instruments)
- stolní vortex: VORTEX-GENIE®2 (spol. Scientific Industries, SI™)
- thermocykler: Professional Thermocycler (spol. Biometra, An Analytik Jena Company)

Pracovní protokol:

DEN 1

1. Do stojánku jsme vyndali pomocí pinzety mikrozkušavky o objemu 0,2 ml a označili si je.
2. Napipetovali jsme do těchto mikrozkušavek dH₂O a zvortexovanou DNA dle našich výpočtů tak, aby byl konečný objem 2,5 µl.
3. Zkušavky jsme umístili do thermocycleru a spustili MLPA program. V této chvíli docházelo k denuraci vzorku DNA po dobu 5 minut při 98°C a následovalo zchlazení vzorků na 25°C.
4. Mezitím jsme si připravili master mix I; pipetovali jsme do 0,2ml mikrozkušavky:
 - n . 0,75 µl pufru (SALSA MLPA Buffer; žlutá čepička zkušavky) + 10%,
 - n . 0,75 µl oligonukleotidových sond (Probemix; černá čepička) + 10%,
 kde *n* je počet aktuálně zpracovávaných vzorků; tento hybridizační master mix jsme na závěr dobře promíchali pipetou a poté ještě krátce zvortexovali.
5. Po proběhnutí denuraci DNA jsme připipetovali 1,5 µl připraveného hybridizačního master mixu do každé zkušavky se vzorkem v thermocycleru. Po připipetování tohoto master mixu I jsme vzorek promíchali pipetou a pokračovali v reakčním programu: inkubace po dobu 1 minuty na 95°C, poté 18 (rozmezí 16-20) hodin při 60°C. V tomto kroku docházelo k hybridizaci sond s DNA.

DEN 2

6. Připravili jsme si ligační master mix II (Ligase-65 master mix):

$n \cdot 12,5 \mu\text{l dH}_2\text{O} + 10\%$,

$n \cdot 1,5 \mu\text{l}$ ligačního pufru A (Ligase buffer A; průhledná čepička) + 10%,

$n \cdot 1,5 \mu\text{l}$ ligačního pufru B (Ligase buffer B; bílá čepička) + 10%,

$n \cdot 0,5 \mu\text{l}$ ligázy (SALSA Ligase-65 enzyme; zelená čepička) + 10%,

kde n je počet aktuálně zpracovávaných vzorků; tento master mix II jsme nevortexovali, jen lehce promíchali pipetou (z důvodu přítomnosti enzymu).

7. Po 18hodinové pauze jsme pokračovali v programu thermocycleru. Vzorky snížily teplotu na 54°C. Když byly vzorky na teplotě 54°C, připipetovali jsme do každé zkumavky se vzorkem 16 μl master mixu II připraveného v předchozím kroku a pipetou promíchali.
8. Pokračovali jsme v programu thermocycleru: 15 minut inkubace při 54 °C (v této fázi dochází k ligaci), následuje 5 minut při 98 °C pro tepelnou inaktivaci ligačního enzymu (Ligase-65 enzyme) a poté pauza při 20°C.
9. Připravili jsme si polymerační master mix III:

$n \cdot 3,75 \mu\text{l dH}_2\text{O} + 10\%$,

$n \cdot 1 \mu\text{l}$ Primer mix (SALSA PCR Primer mix; hnědá čepička) + 10% - syntetické oligonukleotidy, jeden z nich je fluorescenčně značen, dNTPs,

$n \cdot 0,25 \mu\text{l}$ polymerázy (SALSA polymerase; oranžová čepička) + 10% - polymerázu jsme zahřáli na 10 s v ruce pro redukci viskozity,

kde n je počet aktuálně zpracovávaných vzorků. Celý master mix III jsme nakonec promíchali pipetou

10. Při pokojové teplotě jsme přidali 5 μl polymeračního master mixu III ke vzorkům, promíchali pipetou a nechali pokračovat program thermocycleru – 35 PCR cyklů: 30 s při 95°C, 30 s při 60°C, 60 s při 72°C. Program zakončen 20minutovou inkubací při 72°C a poté pauza při 4°C. Poté je program ukončen. Následně byly vzorky ihned dále zpracovány fragmentační analýzou.
11. Fragmentační analýza probíhala v tom samém thermocycleru. Ve flow boxu jsme si připravili a označili osmizkumavkový strip a do každé této mikrozukavky bylo napipetováno 9 μl formamidu (stabilizuje vlákna DNA oddělené, nemají tedy tendenci renaturovat), 0,25 μl zvortexovaného LIZu 500 (standard pro velikosti DNA fragmentů) a 0,75 μl zvortexovaného amplifikátu. Takto připravený strip byl umístěn

do thermocycleru a byl spuštěn fragmentační program (80°C po dobu 2 minut, pak na 4° pauza), poté byl strip odnesen na servisní pracoviště k dalšímu zpracování.

4.3 Mutační analýza

Pokud vyšetření metodou MLPA vyšlo negativní, tedy pokud nebyla zachycena žádná aberace ve vyšetřované oblasti, přistoupili jsme u vybraných pacientů k mutační analýze genu *TRPS1*. Vybrání byli pouze pacienti vykazující fenotypové znaky TRPS, pacienti s izolovanými exostózami bez typických znaků TRPS nebyli do vyšetření tohoto typu zahrnuti, neboť se u nich nepředpokládá žádná mutace v genu *TRPS1*.

4.3.1 Charakteristika metody

Mutační analýza spočívá v amplifikaci jednotlivých kódujících sekvencí (exonů) genu systémem PCR („polymerase chain reaction“, polymerázová řetězová reakce) a jejich následné sekvenaci. PCR je jednou ze základních metod molekulární genetiky, kterou v roce 1983 poprvé provedl Kary Mullis, avšak teoreticky byla popsána již roku 1971 Kjellelem Kleppem. Jedná se o enzymatickou syntézu DNA *in vitro*; reakce využívá syntetické oligonukleotidové primery, které hybridizují s cílovou DNA a ohraničí přesně úsek našeho zájmu. Za pomoci polymerázy a volných nukleotidů dochází k amplifikaci úseku našeho zájmu. Reakci bychom mohli rozdělit do tří stěžejních kroků: (1) rozvolnění templátové dsDNA (denaturace); (2) nasednutí primerů („annealing“); (3) syntéza fragmentu pomocí polymerázy (elongace). Celý cyklus se mnohokrát opakuje, čímž dochází k exponenciální akumulaci fragmentu v reakční zkumavce. Pomocí gelové elektroforézy se následně musí ověřit, zda opravdu došlo k amplifikaci fragmentu (úseku DNA) našeho zájmu. Pokud ano, následuje další krok, ve kterém je produkt výše uvedené reakce přečištěn a zbaven tak solí a zbytku reagensů. Poté je přečištěný PCR produkt použit k následné sekvenační reakci, což je v podstatě asymetrická PCR s využitím ddNTPs (dideoxynukleotidy) a pouze s jedním typem primerů. Dideoxynukleotidy jsou modifikované nukleotity, za které již nelze zapojit další nukleotid. Tyto ddNTPS jsou přidány v malém množství do reakční směsi a jsou označeny čtyřmi různými fluorochromy podle toho, o kterou bázi se jedná (A, T, G, C). v průběhu PCR reakce dochází k tomu, že DNA-polymeráza po nasyntetizování určité části fragmentu zapojí do vlákna jeden ddNTP, čímž se syntéza ukončí. Protože je ddNTPs v reakční směsi relativně málo a DNA-polymeráza je začleňuje na náhodná místa, obsahuje reakční směs po dokončení určitého počtu cyklů velké množství různě dlouhých vláken začínajících od stejného místa určeného primerem avšak končící vždy některým z různě barevně značených ddNTPs. Jedná se o variantu klasické PCR, avšak do reakční směsi se přidá pouze jeden z páru primerů. Dojde tak k amplifikaci přednostně jednoho vlákna DNA, které je následně využito pro čtení na sekvenátoru. Produkt asymetrické PCR je potřeba po sekvenační reakci před vlastním čtením ještě přečistit. Na sekvenátoru jsou pak vlákna DNA citlivě rozdělena podle své délky kapilární elektroforézou a pomocí počítače jsou snímány signály fluorochromů s posledního zařazeného nukleotidu, tedy z ddNTP. Podle toho, jaká barva signálu je zachycena, zaznamená přístroj bázi tohoto nukleotidu. Sekvence nám tedy přesně určí pořadí

jednotlivých nukleotidů ve vyšetřované DNA, tato sekvence je následně porovnána s referenční sekvencí genu (exonů), čímž se odhalí veškeré malé mutace (např. jednonukleotidové delece, *missense* mutace) i jednonukleotidové polymorfismy (SNP).

4.3.2 Amplifikace exonů genu *TRPS1* metodou klasické PCR

Použité chemikálie

- Taq pufr Fermentas s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10x)
- MgCl_2 Fermentas (25 mM)
- dNTP (10 mM)
- Forwarded primer (10 nM)
- Reversed primer (10 nM)
- Taq DNA polymerázy (0,3 U)
- Destilovaná voda ze systému MILLIPOR Gradient; Milli-Q

Použité přístroje

- stolní vortex: VORTEX-GENIE®2 (spol. Scientific Industries, SI™)
- thermocykler: Professional Thermocycler (spol. Biometra, An Analytik Jena Company)

Protokol PCR:

1. Do 0,2ml označených mikrozkuvek jsme se připravili reakční směs o celkovém objemu 15 μl . Pipetovali jsme níže uvedené reagenty v daných objemech a v následujícím pořadí (*Množství dH_2O a DNA bylo pro každý vzorek individuální a odvíjelo se od koncentrace použité DNA, vždy však v součtu představovalo 11,5 μl . Množství DNA v μl bylo voleno tak, aby celkově ve vzorku pro PCR bylo vždy 100-200 ng DNA; tedy čím byla DNA koncentrovanější, tím více dH_2O bylo nutné použít*):

- x μl dH_2O
- 1,5 μl pufru Fermentas (10x)
- 0,9 μl MgCl_2 Fermentas (25 mM)
- 0,2 μl dNTP (10 mM)
- 0,3 μl Forwarded primer (10 nM)
- 0,3 μl Reversed primer (10 nM)
- x μl DNA
- 0,3 μl Taq DNA polymerázy (0,3 U)

Všechny reagenty jsme před použitím zvortexovali (kromě polymerázy), se samotnou polymerázou jsme pak pracovali na ledu a přidali ji do směsi až jako poslední.

2. Reakční směs jsme umístili do thermocycleru a spustili amplifikační program. Pro amplifikaci jednotlivých exonů bylo třeba zvolit konkrétní teplotní profily PCR:

Teplotní profil PCR: TRPS1 exon 2 (158 bp)

96°C/2min – počáteční denaturace

94°C/30s (denaturace)
59°C/30s (hybridizace)
72°C/20s (elongace) } 35 cyklů

70°C/3 min – závěrečná elongace

Teplotní profil PCR: TRPS1 exon 3 a 4 (929 bp a 1130 bp)

96°C/2min – počáteční denaturace

94°C/30s (denaturace)
59°C/30s (hybridizace)
68°C/1 min (elongace) } 35 cyklů

68°C/3 min – závěrečná elongace

Teplotní profil PCR: TRPS1 exon 5 a exon 6 (603 bp a 123 bp)

96°C/2min – počáteční denaturace

94°C/30s (denaturace)
61°C/30s (hybridizace)
72°C/30 s (elongace) } 35 cyklů

70°C/3 min – závěrečná elongace

Teplotní profil PCR: TRPS1 exon 7 (1062 bp)

96°C/2min – počáteční denaturace

94°C/30s (denaturace)
56°C/30s (hybridizace)
68°C/1min (elongace) } 35 cyklů

68°C/3 min – závěrečná elongace

Sekvence primerů použitých při PCR

TRPS1ex2F: 5' aattgcattagcctcctgct 3' (20 bp)

TRPS1ex2R: 5' tgtgccaagaactttccag 3' (20 bp)

TRPS1ex3F: 5' gataaactgtatctgcctttcc 3' (24 bp)

TRPS1ex3R: 5' ctgtctgtactgggaccttg 3' (21 bp)

TRPS1ex4F: 5' atgacacctggaagtaaagtcc 3' (23 bp)

TRPS1ex4R: 5' atttattgtatattcctccgac 3' (25 bp)

TRPS1ex5F: 5' ttcagaacgctgtctttgag 3' (21 bp)

TRPS1ex5R: 5' cctgtagagaaagaatgtgtgtcc 3' (25 bp)

TRPS1ex6F: 5' gatcatgtgactcacctctgacc 3' (23 bp)

TRPS1ex6R: 5' ccaggccaacactgctttat 3' (20 bp)

TRPS1ex7F: 5' cctttatgtattgtatgttctctgc 3' (28 bp)

TRPS1ex7R: 5' acattacaagctattgaattccatt 3' (26 bp)

Následně jsme si museli ověřit pomocí agarové elektroforézy, zda se nám opravdu povedlo namnožit daný exon.

4.3.3 Elektroforéza

Použité chemikálie

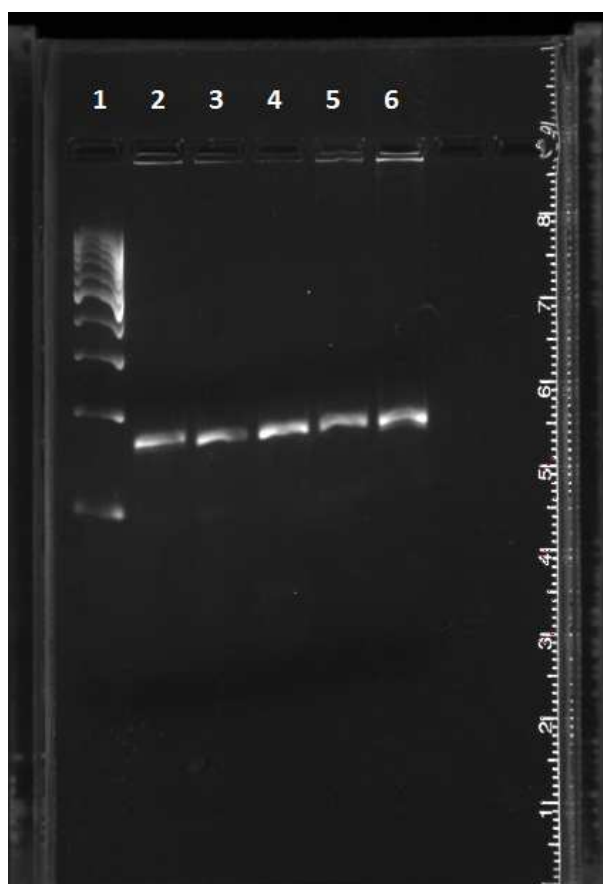
- TBE pufr
- agaróza
- interkalační barvivo: GelRed Nucleid Acid Stain
- velikostní standard: GeneRuler 100 bp DNA ladder #SM0241 (Fermentas Life Sciences)
- modrá loadovací barvička: DNA Loading Dye #R0611 (Thermo Scientific)

Použité přístroje:

- klasická horizontální elektroforetická sada
- snímací přístroj Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System (BIORAD)

Pracovní protokol:

1. Do odměrného válce jsme si připravili 0,5 litru 0,5x koncentrovaného TBE pufru, který nám sloužil jako základní médium pro elektroforézu.
2. Připravili jsme si do Erlenmeyerovy baňky 2% gel z agarózy, a to rozpuštěním 3 g agarózy ve 150 ml TBE pufru připraveného v předchozím kroku.
3. K takto připravené směsi jsme připipetovali 7,5 μ l barviva GelRed Nucleid Acid Stain, které slouží jako detekční činidlo pro DNA, interkaluje se mezi páry bazí a detekuje nám tak DNA.
4. Směs jsme promíchali a dali do mikrovlnné trouby povařit, dokud nevznikla hustá, tekutá homogenní směs.
5. Povařenou směs jsme nechali lehce zchladnout a poté ji nalili do elektroforézové formy takové množství, aby se vytvořila asi 1 cm vysoká vrstva, a do té umístili hřebínek pro vytvoření jamek. Gel jsme nechali 35 minut tuhnout.
6. Ze zatuhlého gelu jsme vyndali hřebínek, gel umístili do elektroforetické vany a přelili pufrem.
7. Na parafilmu jsme smíchali 0,75 μ l velikostního standardu GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas Life Sciences) a 2,5 μ l modré barvičky a tuto směs jsme napipetovali do první jamky.
8. Z PCR vzorku jsme odebrali 5 μ l a toto množství smíchali na parafilmu také se 2,5 μ l barvičky a napipetovali do další jamky. Toto jsme provedli pro všechny PCR vzorky.
9. Spustili jsme elektroforézu při 130 V, 30 minut.
10. Po proběhnutí reakce jsme gel vyhodnocovali a fotili pod UV lampou pomocí snímacího systému Gel DocTM XR+ (BIORAD), který umožňuje výsledek zviditelnit a pomocí počítačového programu ImageLab jsme vyhodnotili, zdali se nám povedlo daný exon naamplifikovat. Příklad výstupu z elektroforézy je na obr. 10.



Obr. 10: Ukázka snímku z gelové elektroforézy – (1) standardní velikostní žebříček po 100 bp, (2-6) naamplifikované exony 2 (158 bp) u vzorků p1, p5, p6, p7 a p12.

4.3.4 Přečištění amplifikátů

Po ověření na elektroforéze jsme namnožený fragment DNA museli přečistit, abychom odstanili soli a nespotřebované reagensy, které by inhibovaly následnou sekvenční reakci. K přečištění jsme použili přečišťovací kit Roche high pure PCR product purification kit (v. 16) od společnosti Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo.

Použité chemikálie

Roche high pure PCR product purification kit (v.16), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo:

- Binding Buffer
- Wash Buffer
- Elution Buffer

- dH₂O
- Produkt PCR

Použité přístroje

- centrifuga: MICRO 240A (spol. Denville Scientific inc.)
- stolní vortex: VORTEX-GENIE®2 (spol. Scientific Industries, SI™)

Pracovní protokol

1. K veškerému amplifikátu jsme přidali 80 µl dH₂O a 500 µl Binding Bufferu a vše řádně zvortexovali.
2. Do sběrné zkumavky jsme usadili kolonku s membránou, směs jsme na tuto kolonku přenesli a centrifugovali na maximální rychlost 14 000 otáček po dobu 1 minuty.
3. Filtrát zachycený ve zkumavce jsme vylili a na membránu připipetovali 500 µl promývacího pufru (Wash Buffer). Centrifugovali jsme na 13 000 otáček po dobu 1 minuty.
4. Filtrát zachycený ve sběrné zkumavce jsme opět vylili a na membránu připipetovali 200 µl promývacího pufru (Wash Buffer). Centrifugovali jsme na 13 000 otáček po dobu 1 minuty.
5. Filtrát i se zkumavkou jsme odstranili a membránu usadili do čisté eppendorfky. Na membránu jsme připipetovali 40 µl elučního pufru (Elution Buffer) a centrifugovali na 13 000 otáček po dobu 1 minuty, čímž jsme získali přečištěný amplifikát.

4.3.5 Sekvenační reakce metodou asymetrické PCR s použitím ddNTPs

Použité chemikálie na reakční směs:

- dH₂O
- 5xSequencing Buffer (Applied Biosystems)
- Primer (F nebo R)
- Produkt PCR
- Sekvenační kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)

Použité přístroje:

- thermocycler: Professional Thermocycler (spol. Biometra, An Analytik Jena Company)

Pracovní protokol:

1. Pro každý vzorek obsahující jeden naamplifikovaný exon jsme si připravili dvě 0,2ml mikrozkušavky, označili je (např. p1ex2F – pacient č. 1, exon 2, primer Forward) a napipetovali do nich 3,5 µl dH₂O a 2 µl sekvenačního pufru.
2. Připitalovali jsme vždy 1 µl jednoho typu primeru (F nebo R); každý sekvenační vzorek obsahoval jen jeden typ primeru, a tedy pro každý PCR vzorek byly připraveny 2 reakční zkumavky

3. Ke každému vzorku jsme přidali 1 μ l sekvenačního kitu.
4. Na závěr jsme přidali do každého vzorku 2,5 μ l PCR produktu.
5. Zkumavky jsme vložili do thermocycleru a spustili sekvenační program (stejný pro všechny exony), teplotní profil programu:

96°C/3 min

96°C/10s

50°C/5s

60°C/3 min

} 35 cyklů

4.3.6 Přečištění po sekvenační reakci

Použité chemikálie:

- 96% ethanol (EtOH I)
- 70% ethanol (EtOH II)

Použité přístroje:

- Centrifuga: Sartorius SIGMA® (spol. Biotech)
- Termoblok: QBO2 (spol. Grant)

Pracovní protokol:

1. K 10 μ l sekvenační směsi (výše popsané) jsme přidali 28 μ l 96% ethanolu (EtOH I) a nechali 15 minut stát při pokojové teplotě.
2. Poté jsme směs stočili na 13 000 otáček po dobu 20 minut, následně jsme odstříkli supernatant na buničinu.
3. Ke zbylé peletě jsme přidali 50 μ l 70% ethanolu (EtOH II) a opět stočili na 13 000 otáček, tentokrát po dobu 10 minut.
4. Po stočení jsme opět na buničinu odstříkli supernatant a mikrozkumavku obsahující peletu s malým zbytkem ethanolu umístili do termobloku na 40°C na dobu asi 10 minut, dokud nedošlo k úplnému vysušení a odstranění ethanolu.
5. Takto připravené zkumavky jsme odnesli do servisní laboratoře.

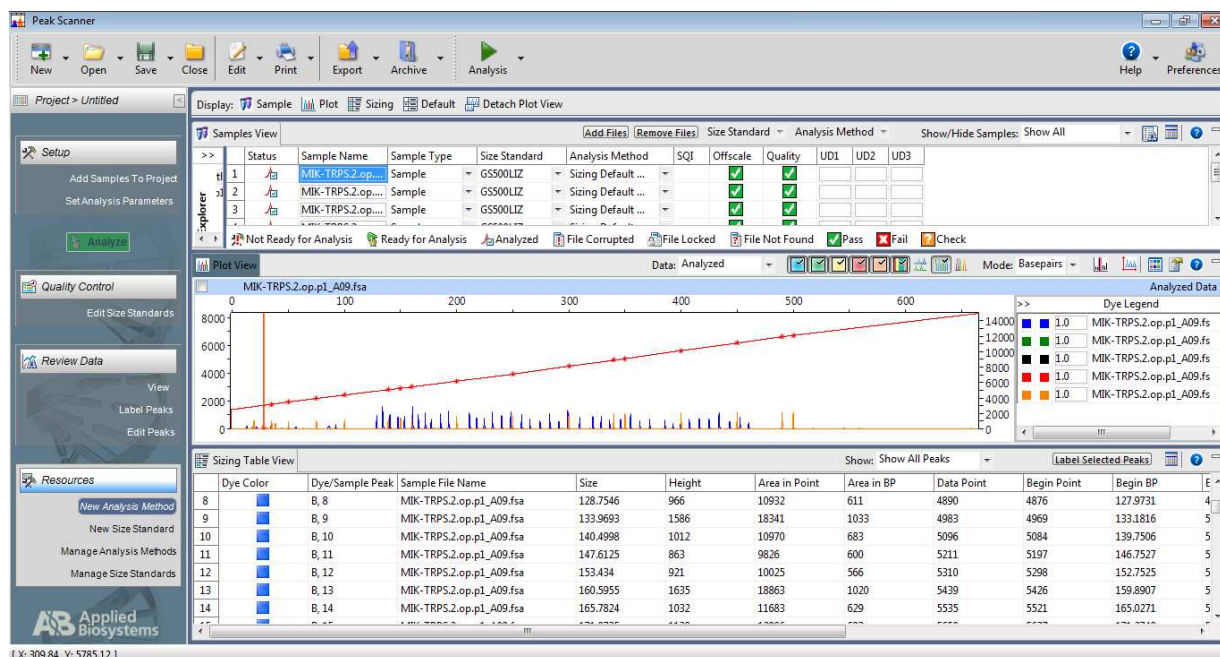
5. Vyhodnocování získaných dat

5.1 Data získaná metodou MLPA

Servisní pracoviště PŘF UK, Laboratoř sekvenace DNA, nám zpracovala data z fragmentační analýzy do formátu *.fsa. Pro každý vyšetřovaný vzorek tedy vznik soubor ve formátu *.fsa, který byl vložen do počítačového programu Peak ScannerTM Software v1.0 (r. 2006) od společnosti Applied Biosystems a vyhodnocen. Ukázka práce v tomto programu je na obr. 11.

V tomto programu byly zjišťovány velikosti jednotlivých píků, přičemž každý pík představuje jednu amplifikovanou sondu a odráží tedy přítomnost určité části genu. Vznikne nám tedy jakýsi „píkový profil“ pokrývající celý gen *TRPS1*, vybrané exony genu *EXT1*⁶, další geny z chromozomové oblasti 8q24 a vybrané referenční oblasti genomu. Aby se píkový profil pacienta mohl vyhodnotit, potřebujeme samozřejmě i píkový profil zdravé osoby, který nám slouží jako vnitřní kontrola. Každý píkový profil jednotlivého pacienta byl srovnán s píkovými profily dvou zdravých kontrolních jedinců a pak také se zprůměrovaným píkovým profilem těchto dvou zdravých osob. Pokud je u pacienta vyšetřovaný úsek genu bez mutace (indel mutace), pak na tento úsek mohou nasednout MLPA sondy a amplifikovat se. Výsledná velikost píku u tohoto pacienta by pak proto měla být téměř shodná s velikostí píku u zdravé kontroly a jejich relativní poměr by proto měl být přibližně roven jedné. Pokud je však v nějakém úseku genu přítomna delece, sondy na DNA nenednou, nedojde k jejich amplifikaci, velikost píku bude oproti zdravé kontrole menší a tutíž i poměr velikosti píku vyšetřované/zdravé osoby bude menší než jedna. Pokud naopak bude přítomna ve vyšetřované oblasti duplikace, sondy nasednou na více míst, a proto bude velikost píku oproti zdravé kontrole větší a poměr velikosti píku vyšetřované/zdravé osoby bude větší než jedna.

⁶ Použitý MLPA reakční kit je designován pouze pro vyšetření pacientů s podezřením na TRPS syndrom. Neslouží ke kompletnímu vyšetření genu *EXT1*. Z tohoto důvodu tento kit neobsahuje sondy pro všechny exony genu *EXT1*, ale pouze sondy pro začátek a konec genu *EXT1*, aby bylo možné spolehlivě zachytit i případný podtyp TRPS II.



Obr. 11: Ukázka práce a zobrazení píkového profilu v programu Peak Scanner Software. Uprostřed vzhled píkového profilu, v dolní části hodnoty velikostí jednotlivých píků.

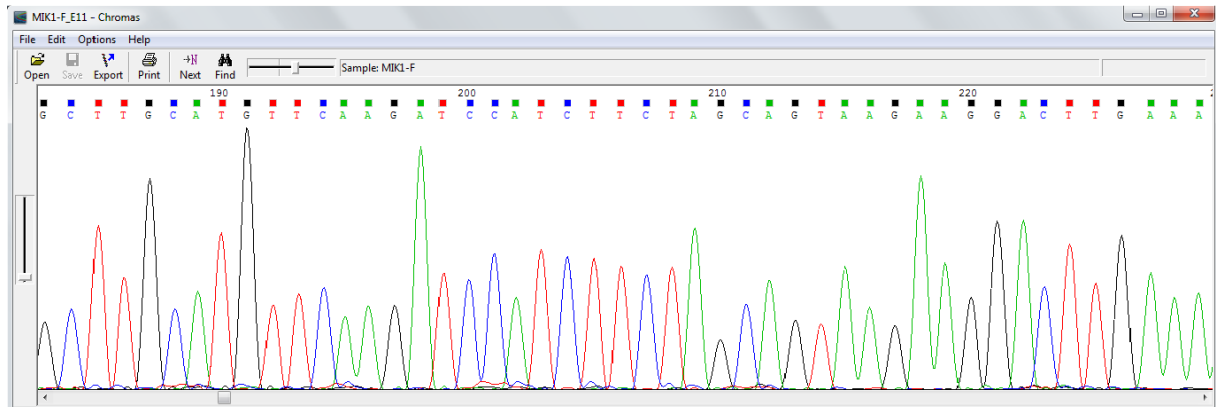
5.2 Data získaná z mutační analýzy

Po sekvenační reakci byla směs přečištěna a sekvence jednotlivých exonů „přečtena“ na sekvenátoru v Servisním pracovišti PŘF UK, Laboratoři sekvenace DNA, a zpracována do formátu *.seq.

Získané sekvence exonů byly zobrazovány v programu Chromas Lite verze 2.1 (2012). Ukázka práce v tomto programu je na obr. 12. Tyto sekvence byly následně porovnávány s referenční sekvencí dostupnou v databázi NCBI (reference sequence NM_014112.4); námi získaná sekvence v programu Chromas Lite byla nejprve převedena do formátu „FASTA“ a porovnána s referenční sekvencí na NCBI v programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tímto krokem jsme se především ujistili, zda se v naší sekvenci nenacházejí homozygotní mutace, přestože jsou tyto mutace velmi nepravděpodobné. Zároveň nás porovnání sekvencí upozornilo na heterozygotní změny, které jsme však vyhodnocovali přímo v programu Chromas Lite. Při tomto vyhodnocování sekvencí jsme se zaměřili především na hledání malých delecí a jednobodových heterozygotních záměn bazí, a to z několika důvodů: (1) TRPS je syndromem dominantním, což znamená, že homozygotní mutace (ať už malé delece či záměny bazí) jsou velice nepravděpodobné; homozygotní mutace byla doposud publikována jen v jediném případě (Ludecke et al. 2001). (2) U TRPS jsou velmi často popisovány různě velké delece nebo naopak právě heterozygotní jednobodové mutace (Ludecke et al. 2001).

Případné nalezené jednobodové změny budou nejprve konfrontovány s databází NCBI (National Center for Biotechnology Information), kde jsou zaneseny všechny polymorfismy (SNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a následně také s databází HGMD (The

Human Gene Mutation Database), kde jsou přehledně vypsány všechny doposud publikované mutace genu *TRPS1* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).



Obr. 12: Ukázka práce v programu Chromas Lite – v programu zobrazena část sekvence exonu 3 pacienta č. 1.

6. Výsledky

6.1 Trichorhinofalangeální syndrom

6.1.1 Souhrnné výsledky

Pomocí analýzy MLPA se podařilo zachytit delecí genu *TRPS1* pouze u jednoho pacienta z celkových 8. Avšak dle studie Ludecke et al. z roku 2001 je téměř u 90% pacientů s fenotypem TRPS nalezena mutace v tomto genu, přičemž asi u poloviny pacientů s potvrzenou mutací se jedná právě o různě velké delece. Velmi podstatnou část mutací však tvoří i jednonukleotidové záměny, proto se u zbylých 7 probandů přistoupilo k sekvenaci všech kódujících částí exonů, tedy exonů 2-7. Sekvenací se podařilo identifikovat mutaci u 2 pacientů. Jeden pacient byl dokonce nositelem dvou různých typů mutací, a to *nonsense* mutace v exonu 4 a malé delecí v exonu 5, přičemž však nelze rozhodnout, zda se obě mutace nacházely na jedné alele, či měl proband na každé alele jednu mutaci. Z publikace Ludecke et al. (2001) však víme, že i mutace obou alel genu *TRPS1* je stav je slučitelný se životem.

Celkem jsme tedy zachytili mutaci u 3 z celkových 8 pacientů, záchytnost mutací tedy byla přibližně 38 %. Jelikož se však jedná o velmi malý soubor pacientů, není statistické hodnocení četnosti nalezených mutací příliš relevantní.

6.1.2 Charakteristika pacientů s pozitivním nálezem

6.1.2.1 Pacient č. 9

Pacient p9 byl muž, který vykazoval typické faciální fenotypové znaky TRPS, především hruškovitý tvar nosu a řídké vlasy. Tento pacient trpěl navíc též mnohočetnými exostózami. Exostotických výběžků byly desítky, lokalizované byly především na dlouhých kostech dolních končetin (nejvíce na holenních a stehenních kostech), tedy na místech, kde jsou exostotózy popisovány nejčastěji. Exostózy měl proband však přítomny i na pažních kostech a velké exostózy měl dále také na obou lopatkách, což si z důvodu velké bolesti vyžádalo operační zákrok. Kromě toho měl tento pacient silnou osteoporózu se snížením hybnosti, mediální rozštěp patra (zevně neviditelný) spojený s potížemi při řeči, polohové anomálie zubů spojené s kompresí zubů v čelistech a Madelungovu deformitu pravého předloktí. Pravé chodidlo měl proband zkrácené o 6 cm a pravou končetinu zkrácenou o 9 cm (zkrácení dolní končetiny o 9 cm je výsledkem operace a prodlužování končetiny, jinak by zkrácení bylo daleko závažnější). Celkově lze říci, že pravá strana vykazovala mnohem více exostotických výběžků a byla mnohem závažněji postižena. Proband nevykazoval žádný stupeň mentální retardace, jeho výška dosahovala 178 cm a hmotnost byla v normě vzhledem k výšce (70 kg). Na základě takového fenotypu bychom probanda zařadili k typu TRPS II.

Analýza MLPA analýza odhalila rozsáhlou delecí v chromozomální oblasti 8q24 (Tab. 4). Tato heterozygotní delecce zahrnovala geny *TRPS1* i *EXT1* a kromě nich též desítky dalších, distálněji lokalizovaných, genů⁷ (Tab. 4). Na základě této skutečnosti můžeme konstatovat, že jsme molekulárně genetickou analýzou potvrdili zařazení probanda k typu TRPS II, tedy Langer-Giedionovu syndromu. Rozsah delecce byl stanoven dle vzdáleností jednotlivých sond v rozmezí přibližně 9,6696-11,9994 Mb. Jedná se tedy o poměrně rozsáhlou delecí a není proto překvapující, že tento pacient byl zároveň jediným pacientem v souboru pacientů od MUDr. Kuklíka, kterému tuto rozsáhlou delecí diagnostikovala i metoda FISH.

Rodiče probanda pro vyšetření dostupní nebyli, i přesto však předpokládáme, že nejsou nositeli delecce, neboť nevykazují žádný ze znaků typických pro TRPS. Proband je tedy s největší pravděpodobností nositelem delecce vzniklé *de novo*.

Delecce tedy byla lokalizována distálním směrem od genu *TRPS1* a nezasahovala tak geny lokalizované proximálně od genu *TRPS1*. Delecce tedy již nepostihla gen *CSMD3* (Tab. 4).

⁷ Vyšetřovací SALSA MLPA kit neobsahuje sondy pro úplně všechny geny oblasti 8q24 tak, jak jdou za sebou. Obsahuje sondy pouze pro vybrané, stěžejní geny v oblasti 8q24. Na první pohled by se tedy mohlo jevit, že pacient má kromě genů *TRPS1* a *EXT1* delecí dalších několika málo genů, ve skutečnosti má však delecí desítek genů, které se v této deletované oblasti nacházejí (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ale sondy na tyto geny nejsou součástí MLPA kitu.

Tab. 4: Schematické znázornění rozsáhlé deletované oblasti u pacienta č. 9. První sloupec obsahuje názvy genů na chromozomu 8, které testuje použitý vyšetřovací kit (růžově a červeně zdůrazněny geny *EXT1* a *TRPS1*), druhý sloupec značí lokalizaci (tedy chromozomální oblast 8q24). V posledním sloupci je uveden poměr velikosti píků po fragmentační analýze u vyšetřovaného pacienta ku průměru velikosti píků dvou negativních zdravých kontrol, přičemž rozsáhlá deletovaná oblast je vyznačena oranžově.

(*) Podrobnější vysvětlení těchto hodnot viz kap. 5 Vyhodnocování získaných dat.

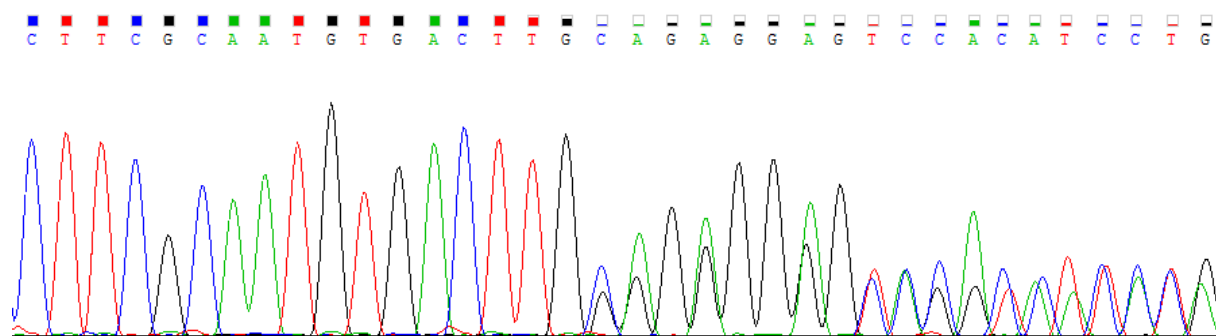
Název genu	Chromozomová lokalizace	Poměr velikosti píků (*)
ASAP1	8q24	1,049022949
MYC	8q24	1,110275447
MYC	8q24	1,020845037
TRIB1	8q24	1,065555372
KIAA0196	8q24	0,499097075
MTSS1	8q24	0,511758669
RNF139	8q24	0,554990788
RNF139	8q24	0,595302618
HAS2	8q24	0,495300894
MTBP	8q24	0,547401907
NOV	8q24	0,514248688
TNFRSF11B	8q24	0,530609869
SAMD12	8q24	0,560499236
EXT1 exon 1	8q24	0,4754557
EXT1 exon 2	8q24	0,555435974
EXT1 exon 8	8q24	0,614177221
EXT1 exon 11	8q24	0,551128645
RAD21	8q24	0,535909551
TRPS1 exon 1	8q24	0,521317782
TRPS1 exon 1	8q24	0,520515475
TRPS1 exon 2	8q24	0,5317588
TRPS1 exon 3	8q24	0,579417336
TRPS1 exon 3	8q24	0,52713216
TRPS1 exon 4	8q24	0,560006968
TRPS1 exon 4	8q24	0,62667774
TRPS1 exon 5	8q24	0,5727432
TRPS1 exon 6	8q24	0,552649647
TRPS1 exon 7	8q24	0,511104794
TRPS1 exon 7	8q24	0,516186003
CSMD3	8q24	0,954620998
CSMD3	8q24	1,16485537
CSMD3	8q24	1,174017307
EBAG9	8q24	1,11014182
EIF3E	8q24	0,988134587

6.1.2.2 Pacient č. 12

Pacientem p12 byla žena, která vykazovala typické znaky TRPS bez známek exostóz. Tato pacientka měla světlé řídké vlasy, hruškovitý tvar nosu, brachydaktylii prstů na ruku (kromě 4. prstů, ty byly svou délkou normální), přičemž ale všechny prsty byly navíc různě vychýlené v interfalangeálních kloubech. Pacientka trpěla artritickými změnami kloubů, především pak kloubů kyčelních. Kyčelní klouby byly navíc dysplastické a vychýlené ze své osy. Kromě toho trpěla pacientka nefrologickými potížemi. Její výška byla 150 cm a hmotnost vzhledem k výšce v mezích normy (51 kg). Na základě fenotypu bychom tedy probanda zařadili k typu TRPS I.

Analýza MLPA u této pacientky neprokázala mutaci, avšak pomocí sekvenace se podařilo odhalit bodovou mutaci (*nonsense*) v exonu 4 a mikrolepci v exonu 5 genu *TRPS1* (sekvenace byla samozřejmě několikrát opakována pro potvrzení správnosti). Molekulárně genetickou analýzou jsme tedy prokázali, že proband náleží k typu TRPS I.

Mikrolepce o velikosti 19 nukleotidů byla heterozygotní, jak ukazuje směsný píkový signál na obr. 13. Rozluštění směsného píkového profilu je pak na obr. 14. Deletovaná sekvenace byla 5' GAGAGGGGCAGACATCCTG '3, v cDNA odpovídá pozici nukleotidů 2420 až 2439 (dle databáze HGMD) a ovlivňuje tím aminokyselinovou sekvenci od pozice 807. Mikrolepce je lokalizována v exonu 5 do míst, kde nejsou žádné funkční domény. Nicméně se touto delecí mění a posouvá celý čtecí rámec (jedná se tedy o *frame-shift* mutaci), čímž je ovlivněna sekvenace i konformace proteinu, především pak GATA zř domény a IKAROS-like zř domény nacházejícími se na konci proteinu, které jsou stěžejní pro interakci s DNA či jinými proteiny.



Obr. 13: Část sekvenace exonu 5 genu *TRPS1* u pacientky p12 – první polovina sekvenace ukazuje standardní homozygotní sekvenci exonu, avšak ve druhé polovině začíná směsný signál, který je výsledkem heterozygotní delecce o velikosti 19 bp. Jedna sekvenace směsného signálu odpovídá bezprostředně navazující referenční sekvenci, druhý signál odpovídá referenční sekvenci vzdálené o 19 nukleotidů.

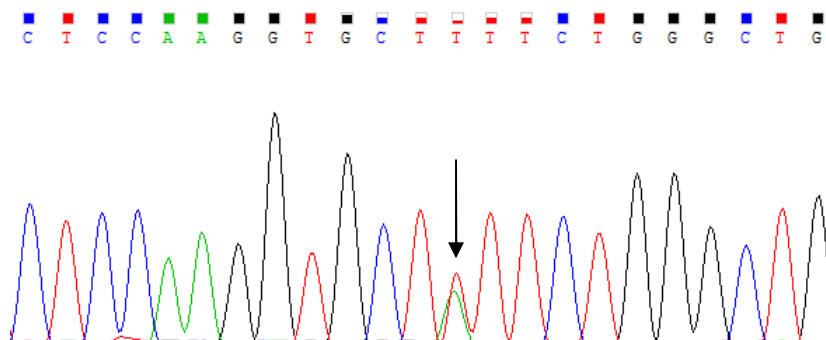
A: 5' ...TTG/GAGAGGGGCAGACATCCTGCGGGGGAGTCCGTCATA... 3'

B: 5' ...TTG/**GAGAGGGGCAGACATCCTGCGGGGGAGTCCGTCATA**... 3'

C: 5' ...TTG/-----**CGGGGGAGTCCGTCATA**... 3'

Obr. 14: Rozluštění sekvence píkového profilu zaznamenaného čtením z přímého primeru – A: část referenční sekvence exonu 5 genu *TRPS1*; B: první sekvence zaznamenaná ze směsného píkového profilu (plně odpovídá referenční); C: druhá sekvence zaznamenaná ze směsného píkového profilu. Červeně vyznačená je heterozygotně deletovaná oblast na jedné alele; zeleně vyznačená již nedeletovaná oblast přítomná v obou alelách (ovšem ve skutečnosti kvůli deleci vůči sobě vzájemně posunutá); sekvence TTG před lomítkem značí část homozygotního signálu před začátkem signálu směsného. Stejný výsledek poskytlo i čtení z reverzního primeru.

Sekvence však odhalila u této pacientky bodovou mutaci v exonu 4 genu *TRPS1*. K záměně nukleotidu došlo na pozici 1765, kde byl adenin (v přímém směru) v jedné alele nahrazen thyminem (Obr. 15). To vyústilo v heterozygotní změnu tripletu kódujícího aminokyselinu lysin na pozici 589. Triplet AAG kódující lysin byl změněn na terminační triplet TAG. Identifikovaná bodová mutace se nachází v místě, kde nejsou žádné funkční domény. Tato mutace dosud nebyla v literatuře popsána.

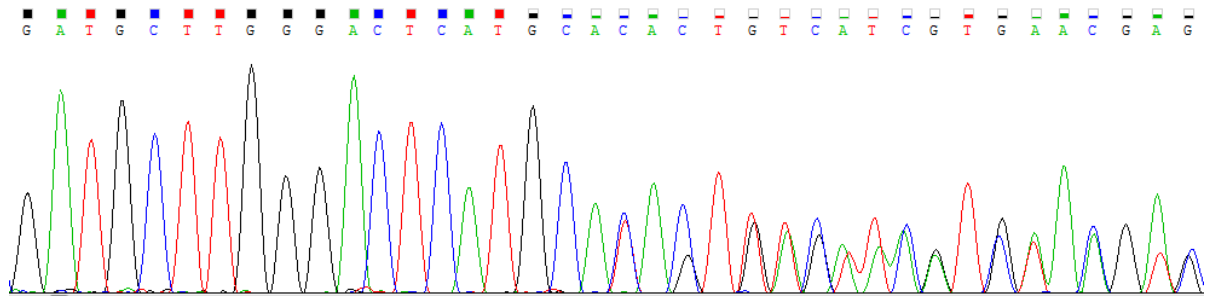


Obr. 15: Část sekvence exonu 4 čteného ze zpětného primeru. Šipka označuje místo, kde došlo k heterozygotní záměně báze. Tato bodová mutace A1765T je klasifikována jako *nonsense* mutace, neboť vede ke vzniku terminačního kodonu. Stejný výsledek poskytlo i čtení z přímého primeru, jen byla sekvence o něco hůře čitelná.

6.1.2.3 Pacient č. 15

Pacientem p15 byla žena s fenotypem TRPS. Bohužel u této pacientky nebyla k dispozici žádná data o osobní ani rodinné anamnéze.

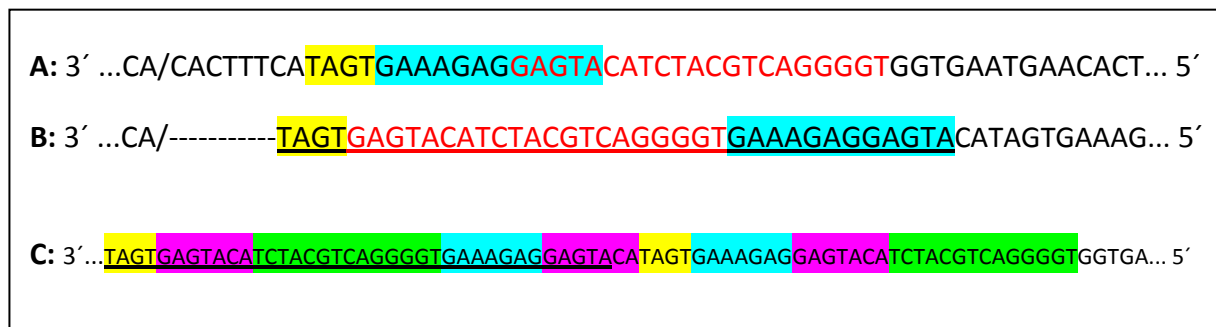
Sekvence odhalila u této pacientky mutaci v exonu 4 genu *TRPS1*, jak ukazuje směsný signál na Obr. 16. Po rozkódování směsného profilu jsme zjistili, že mutace a posun čtecího rámce je způsoben delecí 6 nukleotidů CACTTT a následnou inzercí 37 nukleotidů (Obr. 17). Když jsme se poté důkladněji podívali na sekvenci inserce, zjistili jsme, že tato inserce je svou sekvencí shodná s různými částmi původní, referenční sekvence, avšak zmnožené úseky jsou vůči původní sekvenci přeorganizované (Obr. 18). Identifikovaná mutace byla tedy ve své podstatě velmi komplexní přestavbou.



Obr. 16: Část sekvence exonu 4 genu *TRPS1* u pacienta p15 – první polovina sekvence ukazuje standardní homozygotní sekvenci exonu, avšak ve druhé polovině začíná směsný signál, který je výsledkem komplexní heterozygotní přestavby skládající se z delecí a následné inserce několika nukleotidů. Inserce je navíc v podstatě duplikací různých částí původní referenční sekvence. Výsledkem je posun čtecího rámce, tzv. *frame-shift*. Čteno z reverzního primeru, z přímého primeru byla sekvence hůře čitelná, neboť mutace se nacházela ke konci exonu 4.

A: 3' ...CA/CACTTTCATAGTGAAAGAGGAGTACATCTACGTCAGGGGTGGTGAATGAA... 5'
 B: 3' ...CA/CACTTTCATAGTGAAAGAGGAGTACATCTACGTCAGGGGTGGTGAATGAA... 5'
 C: 3' ...CA/-----TAGTGAGTACATCTACGTCAGGGGTGAAAGAGGAGTACATAGTG... 5'

Obr. 17: Rozluštění sekvence píkového profilu zaznamenaného čtením ze zpětného primeru – **A:** část referenční sekvence exonu 4 genu *TRPS1*; **B:** první sekvence zaznamenaná ze směsného píkového profilu (plně odpovídá referenční sekvenci); **C:** druhá sekvence zaznamenaná ze směsného píkového profilu. Červeně vyznačená je heterozygotně deletovaná oblast na jedné alele; modře je vyznačená inserce (obrázek tedy znázorňuje situaci, kdy delecí i inserce leží v téže alele); zeleně vyznačená již shodná oblast přítomná v obou alelách (shodně pokračuje dále), ovšem kvůli inserci vůči sobě vzájemně posunutá; sekvence CA před lomítkem značí část standardního homozygotního signálu před začátkem signálu směsného. V jedné alele (Obr. C) tedy chybí 6 nukleotidů CACTTT (červeně) a navíc je tam vmezeřeno 37 nukleotidů (modře). Stejný výsledek poskytlo i čtení z přímého primeru, avšak sekvence byla ke konci špatně čitelná.



Obr. 18: Grafické znázornění a rozluštění inserce – **A:** část referenční sekvence exonu 4; **B:** sekvence s heterozygotní mutací získaná ze smíšeného signálu - inserce o 37 nukleotidech je podtržena; barevně znázorněno, že tato inserce je svou sekvencí shodná s různými částmi referenční sekvence; **C:** grafické znázornění komplexnosti přestavby – z barevně vyznačené sekvence je patrné, že proband měl v jedné alele určité části sekvence zmnožené; vlastní inserce je podtržena.

6.2 Exostózová choroba

6.2.1 Souhrnné výsledky

Z celkových 8 pacientů vykazujících pouze fenotyp izolovaných exostóz jsme pomocí metody MLPA odhalili mutaci jen u jednoho z nich. Jedná se o očekávaný výsledek, neboť vznik exostóz je podmíněn i mutacemi v genu *EXT2*. Navíc jsme nevyšetřovali všechny exony genu *EXT1*.

6.2.2 Charakteristika pacientů s pozitivním nálezem

6.2.2.2 Pacient č. 11

Pacientkou č. 11 byla žena trpící mnohočetnými exostózami. Její výška byla 158 cm a hmotnost byla vzhledem k výšce v normě (54 kg). Pacientka vykazovala disproporci v oblasti předloktí, pravděpodobně z důvodu přítomnosti větších exostotických výběžků, které bránily normálnímu růstu předloktí.

Metoda MLPA u této pacientky odhalila delecii exonu 11 genu *EXT1* (Tab. 5) v podoblasti 8q24.11. Maximální možný rozsah delecce mohl činit 960,4 kb.

U této pacientky se jedná o familiární případ exostózové chodoby. Exostózovou chorobou trpěl též její otec, sestra otce (tedy teta) a též otec otce (tedy dědeček). Sama pacientka má dvě dcery, přičemž obě dvě vykazují fenotyp izolovaných exostóz a lze se tedy domnívat, že jsou nositeli stejné mutace jako jejich matka. Celkem je tedy v rodokmenu 6 osob s totožným onemocněním. K dispozici pro vyšetření však byla pouze tato jedna pacientka.

Tab. 5: Schematické znázornění zachycené delece u pacientky č. 11. První sloupec obsahuje názvy genů na chromozomu 8, které testuje použitý vyšetřovací kit (růžově a červeně zdůkazněny geny *EXT1* a *TRPS1*), druhý sloupec značí lokalizaci (tedy chromozomální oblast 8q24). V posledním sloupci je uveden poměr velikosti píků po fragmentační analýze u vyšetřovaného pacienta ku průměru velikosti píků dvou negativních zdravých kontrol, přičemž deletovaná oblast je vyznačena oranžově.

(*) Podrobnější vysvětlení těchto hodnot viz kap. 5 Vyhodnocování získaných dat.

Název genu	Chromozomová lokalizace	Poměr velikosti píků (*)
ASAP1	8q24	0,991446732
MYC	8q24	0,986276092
MYC	8q24	0,861131278
TRIB1	8q24	0,943427806
KIAA0196	8q24	0,888444927
MTSS1	8q24	0,926774036
RNF139	8q24	1,07306058
RNF139	8q24	0,931170331
HAS2	8q24	1,068655113
MTBP	8q24	1,032078951
NOV	8q24	0,984702301
TNFRSF11B	8q24	0,926569722
SAMD12	8q24	1,065770264
EXT1 exon 1	8q24	0,895655267
EXT1 exon 2	8q24	0,943142949
EXT1 exon 8	8q24	1,017865273
EXT1 exon 11	8q24	0,478852689
RAD21	8q24	1,037165879
TRPS1 exon 1	8q24	1,031293806
TRPS1 exon 1	8q24	0,953232669
TRPS1 exon 2	8q24	1,077231501
TRPS1 exon 3	8q24	1,053365759
TRPS1 exon 3	8q24	1,005286376
TRPS1 exon 4	8q24	1,080396059
TRPS1 exon 4	8q24	0,99273324
TRPS1 exon 5	8q24	0,974369883
TRPS1 exon 6	8q24	1,018886831
TRPS1 exon 7	8q24	1,027115026
TRPS1 exon 7	8q24	0,988017744
CSMD3	8q24	0,933983142
CSMD3	8q24	1,085561647
CSMD3	8q24	1,193385276
EBAG9	8q24	0,985023931
EIF3E	8q24	0,945605005

7. Diskuze

V této diplomové práci byla provedena molekulárně genetická analýza chromozomové oblasti 8q24 na souboru 16 pacientů, z nichž 8 vykazovalo fenotyp TRPS a 8 trpělo izolovanými exostózami.

Pacienti s izolovanými exostózami bez typických znaků TRPS byly do studie zahrnuti, protože již bylo publikováno několik případů, kdy u pacienta s exostózovou chorobou bez typických či jen s několika mírnými znaky TRPS byla identifikována rozsáhlá delece v oblasti 8q23-24 a pacient byl tak diagnostikován jako LGS (čili TRPS II). Faciální znaky TRPS jsou totiž silně variabilní a fenotypový projev může být různě závažný a celkově vykazuje TRPS široké klinické spektrum symptomů. Navíc pokud je pacientova mutace mozaikou, mohou dokonce některé charakteristické fenotypové znaky zcela chybět (Shanske et al. 2008). Právě exostózy se tak mohou stát vodítkem k odhalení LGS. Provedení molekulárně genetické analýzy a potvrzení či vyvrácení domnělé diagnózy je tedy užitečné právě v případech nevykazujících klasickou klinickou prezentaci syndromu.

Základním vyšetřením chromozomální oblasti 8q24 všech pacientů byla molekulárně genetická metoda MLPA. Touto metodou se u 2 pacientů z celkových 16 podařilo prokázat kauzální mutaci způsobující jejich fenotyp. Konkrétně metoda MLPA odhalila rozsáhlou deleci u jednoho pacienta (p9) s TRPS a mikroleci u jednoho pacienta (p11) s exostózovou chorobou. Oba dva pozitivní pacienti byli vyšetřováni opakovaně, aby se ověřila správnost výsledku.

Pacient p9 vykazoval typické fenotypové znaky TRPS, trpěl mnohočetnými exostózami a nevykazoval žádný stupeň mentální retardace. Z klinického hlediska zajímavá je skutečnost, že tento pacient měl mnohem více exostotických výběžků na pravé straně těla a celkově byla prava strana těla i mnohem závažněji postižena. Dle MUDr. Kuklíka lze proto spekulovat, že takovýto fenotyp by mohl být výsledkem vysokoprocentní mozaikovitě mutace v určitých tkáních či v určitých částech těla. Nicméně dle MLPA byl tento pacient nositelem rozsáhlé heterozygotní delece v oblasti 8q24 (což ovšem vysokoprocentuální mozaiku nevyklučuje), která kromě genů *TRPS1* a *EXT1* zasahovala i další desítky okolních, distálněji lokalizovaných, genů a její rozsah byl dle použitých vyšetřovacích sond stanoven v rozmezí 9,6696-11,9994 Mb. Proband tedy náleží k typu TRPS II. Delece byla lokalizována distálním směrem od genu *TRPS1* a nepostihla tak gen *CSMD3*. Předpokládá se, že pacienti, u kterých delece zasahuje proximálně od genu *TRPS1* a postihuje tedy i gen *CSMD3*, trpí mentální retardací. Naopak pacienti s distální delecí od genu *TRPS1* (a tedy s oběma kopiemi genu *CSMD3*) jsou mentálně v pořádku (Ludecke et al. 1991; Riedl et al. 2004). Tuto hypotézu podporuje i tento proband, jehož inteligence je normální a delece nezasahovala gen *CSMD3*.

Pozoruhodné také je, že výška probanda činila 178 cm. U pacientů s TRPS II je totiž většinou popisováno razantní snížení postavy a těžká růstová retardace, pravděpodobně z důvodu kumulativního efektu, jelikož geny *TRPS1* a *EXT1* se oba podílejí na skeletálním růstu. U tohoto pacienta je však nutno vzít v potaz, že absolvoval několik chirurgických a plastických operací za účelem odstranění exostóz a tedy zlepšení růstu. Navíc pak ještě

podstoupil prodlužování pravé dolní končetiny. Z těchto důvodů je pravděpodobně jeho výška téměř normální.

Pacient p11 byla žena s typickým izolovaným exostózovým fenotypem, u které se podařilo odhalit delecí v genu *EXT1*. Delece však mohla být i rozsáhlejší, distálněji mohla zasahovat i exony 10 a 9, na které bohužel ve vyšetřovacím kitu nebyly přítomné sondy a tudíž tuto případnou skutečnost nebylo možné odhalit. Delece však mohla zasahovat i proximálněji a postihnout např. geny *MED30* (Mediator complex subunit 30) a *SLC30A8* (Solute carrier family 30 zinc transporter member 8), které jsou lokalizovány za genem *EXT1* a na které též nebyly v kitu přítomné sondy. Teprve po těchto genech následuje gen *RAD21*, který víme, že pacientka deletovaný neměla. Spolehlivě lze tedy pouze konstatovat, že delece byla lokalizována do podoblasti 8q24.11 a zasahovala exon 11 genu *EXT1*, její maximální velikost činila 960,4 kb (její minimální velikost nelze spolehlivě určit), avšak její přesný rozměr bohužel není možné použitou metodou zmapovat.

U zbylých 7 pacientů s izolovanými exostózami jsme metodou MLPA neodhalili žádnou mutaci v genu *EXT1*. Pro tuto skutečnost můžeme mít hned několik vysvětlení:

(1) Vyšetřovací SALSA MLPA kit obsahoval sondy pouze pro vyšetření exonů 1, 2, 8 a 11 genu *EXT1*; je tedy možné, že pacient mohl mít mikrolececi jiných exonů genu *EXT1*, než na které byly ve vyšetřovacím kitu přítomné sondy.

(2) Pacient nemusel mít mutaci v exonech genu *EXT1*. Mohl být nositelem mutace v intronech či v okolí genu *EXT1*, např. v promotorovém regionu či v regulačních oblastech. Námi použitý SALSA MLPA kit neobsahoval sondy pro vyšetření intronů ani pro podrobné a přesné vyšetření okolí genu *EXT1*. Případ, kdy pacient s exostózami vykazoval delecí pouze v intronu (a kdy nebyla nalezena mutace v žádném z exonů), byl již publikován v roce 2013 (Waijjer et al. 2013).

(3) Pacient mohl mít exostózy plynoucí z mutace v jiném genu, nejpravděpodobněji v homologním genu *EXT2*, jehož mutace je také zodpovědná právě za vznik mnohočetných izolovaných exostóz. Avšak jako vhodní kandidáti se jeví i jiné geny, např. geny *EXT3* či *EXTL* geny („*EXT-like geny*“) *EXTL1*, *EXTL2*, *EXTL3* fungující v téže biologické dráze, která zahrnuje adhezi či polymerizaci heparan sulfátových řetězců (Wuyts et al. 1998; Wuyts and Van Hul 2000; Jennes et al. 2012).

(4) I přes podrobná vyšetření (včetně genového okolí, nekódujících oblastí a homologních *EXT* genů) se přibližně u 4-15 % pacientů (údaj se liší v závislosti na studii) nepodaří na molekulární úrovni odhalit příčinu vzniku jejich exostózových výběžků (Waijjer et al. 2013; Wuyts et al. 1998).

Ani u 7 z celkových 8 pacientů s fenotypem TRPS metoda MLPA neodhalila žádnou mutaci. Protože však velmi podstatnou část mutací tvoří bodové mutace, které metoda MLPA nezachytí, přistoupilo se u zbývajících 7 pacientů s TRPS k sekvenaci všech kódujících částí exonů (tedy kódujících částí exonů 2-7) genu *TRPS1*. Sekvenací exonů se podařilo zachytit mutace u dalších 2 pacientů, přičemž u jednoho byly nalezeny dokonce dvě různé mutace.

U probanda p12 se metodou sekvenace podařilo odhalit *nonsense* mutaci na pozici 1765 v exonu 4. Tato mutace A1765T vedla ke vzniku terminačního kodonu, a tedy k předčasnému ukončení translace. Dále byla však tato pacientka nositelkou mikrodelece o velikosti 19 nukleotidů v exonu 5. Ze sekvenace nelze bohužel říci, zdali pacientka měla bodovou mutaci na jedné alele a delecii na druhé alele (a tudíž ji nevznikal žádný „wild-type“ protein TRPS1) nebo zdali se obě mutace nacházely v jedné alele a pacientka tudíž exprimovala protein TRPS1 alespoň z jedné nemutované alely. Pokud by však obě mutace ležely v téže alele, bodová *nonsense* mutace v exonu 4 vedoucí k terminačnímu kodonu by znamenala předčasné zastavení translace a delece v exonu 5 by tudíž z hlediska proteinu byla irelevantní. V každém případě i samotná bodová mutace taktéž vyúsťuje ve ztrátu důležitých domén na konci proteinu, především pak GATA zf domény a IKAROS-like zf domény, které jsou stěžejní pro interakci s DNA či jinými proteiny.

Z dostupného rodokmenu se lze však domýšlet, že pacientka nesla obě detekované mutace v jedné alele, neboť má dva syny, přičemž první syn má totožný fenotypový projev jako ona (a lze se tedy domnívat, že zdědil mutaci) a její druhý syn nenesl žádné fenotypové známky TRPS, je zcela zdravý a tudíž musel zdědit zdravou („wild-type“) alelu od své matky. Bohužel však ani jeden ze synů nebyl dostupný pro vyšetření. Přestože rodiče pacientky nebyli k dispozici pro vyšetření, domníváme se, že byla nositelkou mutace (mutací) vzniklých *de novo*, neboť ani jeden z rodičů nevykazoval známky TRPS.

U pacientky p15 sekvenace odhalila mutaci v exonu 4. Po rozkódování smíšeného píkového profilu ze sekvenace se ukázalo, že tato mutace je velmi komplexní přestavbou, neboť se skládala z delece 6 nukleotidů CACTTT a inserce 37 nukleotidů. Inserce byla navíc svou sekvencí shodná s různými částmi původní, standardní sekvence, avšak jednotlivé úseky byly vůči původní sekvenci přeorganizované. Lze si představit dvě následující situace. První, že pacientka měla jednu alelu původní, nemutovanou a druhou alelu mutovanou z důvodu delece a následné inserce. Na jedné alele by tedy došlo k posunu čtecího rámce a tvorbě špatného proteinu, avšak druhá alela by byla původní, nemutovaná a tudíž by z ní vznikl standardní protein. Lze však též spekulovat o druhé možnosti, a to že pacientka mohla mít delecii 6 nukleotidů CACTTT na jedné alele a inserci 37 nukleotidů na druhé alele, tedy že mohla mít obě alely mutované. Ze sekvenace bohužel nelze určit, která z těchto možností je správná. Teoreticky pokud by pacientka měla na jedné alele delecii 6 nukleotidů, chyběly by v sekvenci proteinu pouze dvě aminokyseliny, ale čtecí rámec by se nezměnil. Tudíž by zůstaly zachovány důležité domény na konci proteinu. Samotná inserce na druhé alele by ale vedla ke změně čtecího rámce a tvorbě mutovaného proteinu.

Celkem se tedy použitými metodami podařilo identifikovat mutaci u 3 pacientů s TRPS, což znamená, že záchytnost mutací byla přibližně 38 %. Nicméně hodnocení záchytnosti mutací není příliš relevantní, neboť se jednalo o velmi malý soubor pacientů. U 5 pacientů však ani přesto nebyla odhalena žádná mutace tohoto genu (a dokonce nebyl nalezen ani žádný jednonukleotidový polymorfismus, SNP). To může mít několik vysvětlení:

(1) Sekvenanční reakce byla prováděna pouze pro kódující části exonů (tedy exonů 2-7), jejichž translací vzniká protein TRPS1. Pomocí sekvenace jsme tedy nehledali mutace

v nekódujících oblastech (exon 1 a převážná část exonu 7), intronech a potenciálních regulačních elementech genu *TRPS1*. Regulační elementy u genu *TRPS1* zatím sice nebyly identifikovány, nicméně se dá předpokládat, že takovéto struktury existují. Podporou pro toto tvrzení budiž případ existence dalších genů ovlivňující růst a vývoj kostí (např. gen *SHOX*), u kterých již tyto regulátory (konkrétně „enhancery“) byly nalezeny. Navíc byly i publikovány mutace v těchto jejich identifikovaných regulačních elementech, přičemž tyto mutace vedly ke stejnému fenotypu – a tedy ke vzniku daného onemocnění – jako právě mutace v genu samotném (Bertorelli et al. 2007; Chen et al. 2009).

(2) Metodou MLPA jsme sice vyšetřili chromozomální oblast 8q24 a tedy okolí genu *TRPS1*, nevyšetřovali jsme ale chromozom 8 jako celek. Kromě toho, metoda MLPA nám ukáže, jak je vyšetřovaná oblast v genomu zastoupena (tedy zda je určitá oblast duplikována či naopak chybí), neřekne nám však nic o její orientaci a lokalizaci v rámci genomu. Je tudíž možné, že na osmém chromozomu mohlo dojít k inverzi nebo také k delecii v jiné oblasti, čímž se mohl gen *TRPS1* dostat do blízkosti jiného genu či pod kontrolu jiného regulačního elementu některého genu, což mohlo ovlivnit jeho expresi a dát tak vznik fenotypu TRPS. V takovéto situaci se tedy gen *TRPS1* dostává do jiného, nestandardního genového okolí a zapůsobí tzv. „poziční efekt“. Překvapivé je, že poziční efekt na gen *TRPS1* způsobený chromozomovými zlomy v oblastech 8q22-8q24 byl už také popsán, avšak nečekaně ve dvou zcela odlišných případech případech, a to v souvislosti jednak s TRPS (Crippa et al. 2014; David et al. 2013) a jednak v souvislosti s hypertrichózou Ambrasova syndromu (Fantauzzo et al. 2008b). Pozoruhodné ovšem je, že k manifestaci fenotypu TRPS došlo tehdy, pokud byla exprese genu v důsledku zlomu zvýšena (David et al. 2013), avšak k manifestaci fenotypu Ambrasova syndromu došlo z důvodu snížené exprese genu *TRPS1* (Fantauzzo et al. 2008b). Lze tedy spekulovat, že určitý fenotypový projev se vyvine v závislosti na tom, do jakého konkrétního genového okolí se gen *TRPS1* z důvodu zlomu dostane.

(3) Již bylo popsáno a publikováno relativně hodně případů, kdy u pacienta s typickými fenotypovými znaky TRPS nebyla nalezena mutace v genu *TRPS1* (např. Ludecke et al. 2001). Kromě toho, že tento jev může být způsoben mutací v regulačních elementech v okolí daného genu, Shanske et al. v takových případech navrhuje, že by se měly testovat i další tkáně pacienta, neboť byl zaznamenán případ somatické mozaiky, kdy jen velmi malé procento buněk periferní krve neslo delecii genu a naopak téměř všechny kožní fibroblasty nesly deletovaný gen (Shanske et al. 2008). Tudíž pokud provádíme vyšetření pouze ze vzorku periferní krve, je možné, že mutovaných buněk je v periferní krvi velmi málo a my tak dostaneme falešně negativní výsledek.

(4) Další možnou příčinou tak malé záchytnosti mutací jsou tzv. „TRPS-like“ fenotypy. Bylo zjištěno, že mutace genů, jejichž produkty se účastní interakce s genem *TRPS1* či s jeho proteinem a regulují tak jeho aktivitu (např. mutace v genu *SOX9* a v jeho okolí), vedou k chorobám s fenotypovými podobnostmi k TRPS I a TRPS III. I to je další důkaz, že molekuly *SOX9* a *TRPS1* fungují v téže vývojové dráze (Fantauzzo et al. 2012). Navíc nelze vyloučit, že i mutace v dalších genech (kódujících tak mutované a nefunkční produkty), které regulují

činnost genu *TRPS1* a aktivitu jím kódovaného proteinu, popřípadě mutace v genech fungujících ve stejné vývojové dráze, vedou k fenotypu TRPS či fenotypu podobnému.

(5) Je popsáno mnoho syndromů, které ve svém fenotypu zahrnují (částečnou) alopecii, strukturní abnormality nosu, zubů, dlaní či skeletární defekty a částečně tak „mimikují“ fenotypové spektrum TRPS I. Pokud navíc u pacienta s TRPS nejsou typické fenotypové znaky zřetelné či některé chybí, lze tyto syndromy vzájemně zaměnit. Jedná se např. o Orofaciodigitální syndrom způsobený mutací v genu *OFD1* na chromozomu X (OMIM #311200), Larsenův syndrom způsobený mutací genu *LAR1* na 3. chromozomu kódujícího cytoplazmatický protein filamin B (OMIM #150250), Cloustonův syndrom způsobený mutací v genu *GJB6* na 13. chromozomu (OMIM #129500), Ellis-van Creveldův syndrom způsobený mutací na 4. chromozomu v genu *EVC* či mutací v nehomologním genu *EVC2* (OMIM #225500) či Coffin-Sirisův syndrom (OMIM #135900) způsobený mutacemi v genech *ARID1A*, *ARID1B*, *SMARCA4*, *SMARCB1* či *SMARCE1*, přičemž každý z těchto genů se podílí na tvorbě jedné podjednotky několika různých SWI/SNF proteinových komplexů. Na druhou stranu je pravda, že většina těchto syndromů je extrémně vzácná, doposud bylo na celém světě publikováno jen několik málo případů těchto syndromů. Tyto syndromy jsou dokonce tak raritní, že zatím nebylo možno stanovit jejich prevalenci (Carrington et al. 1994). Je tedy otázka, jak velká je šance, že by takový člověk byl přítomen právě v našem vyšetřovaném souboru.

Do budoucna by určitě bylo zajímavé vyšetřit pacienty s LGS, kteří kromě charakteristických znaků vykazují i další, atypické znaky, zdokumentovat u nich rozsáhlost delece a zjistit tak, které geny se podílí na vzniku právě těchto atypických znaků.

8. Závěr

Trichorhinofalangeální syndrom je vzácný autozomálně dominantní syndrom, který obecně zahrnuje skeletální dysplázii s charakteristickou triádou vlasových, kraniofaciálních a skeletálních abnormalit. Příčinou jeho vzniku na molekulární úrovni je mutace genu *TRPS1* na chromozomu 8q. V současné době se vymezují tři typy tohoto syndromu – TRPS I, TRPS II a TRPS III. Typ TRPS III je ve svých fenotypových projevech nejzávažnější a je způsoben výhradně *missense* mutacemi v exonu 6, a to v části kódující GATA DNA-vazebný motivu zinkového prstu. Typ TRPS I je co se fenotypového projevu týče naopak nejmírnější, je způsoben mutací v genu *TRPS 1*, přičemž ve většině případů se jedná o různě velké delece a též bodové mutace (kromě *missense* mutací v převážné části exonu 6) a ze všech typů se vyskytuje nejčastěji. Typ TRPS II je typickým syndromem přilehlých genů, neboť jeho příčinou je rozsáhlejší delece v chromozomové oblasti 8q24, která kromě genu *TRPS1* zahrnuje i gen *EXT1*. Pacienti s TRPS II tedy kromě typického fenotypu TRPS vykazují i přítomnost mnohočetných exostóz právě z důvodu delece genu *EXT1*.

V našem souboru 16 pacientů jsme použitými metodami odhalili mutaci u 1 probanda s exostózami a u 3 probandů s TRPS. Tyto tři probandy s TRPS jsme charakterizovali jako typy TRPS II, TRPS I a TRPS I. Všichni tři přitom nesli mutace, které doposud v literatuře nebyly

publikovány. Naše identifikace typů TRPS je naprosto v souladu v pozorovanou četností typů TRPS. Nejčastější je právě typ TRPS I, vzácnější je typ TRPS II a raritní je typ TRPS III. Právě typ TRPS III jsme v našem souboru nezaznamenali.

Odhalit mutaci se nám však podařilo pouze u 3 pacientů s TRPS z celkových 8, což odpovídá záchytnosti asi 38 %. V publikované studii z roku 2001 však byla identifikována mutace u téměř 90 % pacientů (Ludecke et al. 2001). Naši malou záchytnost můžeme vysvětlit tím, že jsme pracovali s velmi malým souborem pacientů, hraje zde tedy velkou roli náhoda a hodnocení záchytnosti mutací není v našem případě relevantní.

Dle publikovaných studií je možné, že některé genetické varianty genu *TRPS1* či některé polymorfismy (které nejsou považovány za mutaci s klinickým významem anebo je jejich klinický význam nejasný) mohou mít přesto efekt na fenotyp, avšak velmi mírný. Zdá se, že tyto varianty mohou ovlivňovat geometrii kyčelního kloubu, denzitu kostní hmoty, délku femorálního krčku či dokonce přispívat k rozvoji osteoporózy (Ackert-Bicknell et al. 2012). Lze tedy spekulovat, že nejen mutace, ale i SNP v genu *TRPS1* mohou v případě TRPS vykazovat klinickou prezentaci, ovšem jen velmi mírnou.

Do budoucna by v problematice trichorhinofalangeálního syndromu bylo jednoznačně užitečné identifikovat a zamapovat „upstream“ regulační elementy genu *TRPS1*, neboť je známo, že i mutace regulačních elementů mohou být zodpovědné za vznik typického fenotypu. Pakliže se zatím v doposud nejpočetnější studii poražilo u téměř 90 % pacientů vykazujících fenotyp TRPS zachytit mutaci genu *TRPS1*, po identifikování regulačních elementů a přesném vyšetření „upstream“ oblasti by procento zachycených mutací mohlo být ještě vyšší. Všeobecně se předpokládá, že nějaké takové regulační elementy v „upstream“ oblasti tohoto genu existují, nicméně zatím nebyly objeveny.

Bylo by též přínosné zjistit, jakou úlohu hraje gen *TRPS1* a jeho „overexprese“ v regulaci růstu zdravých a rakovinných buněk. Vysoký stupeň exprese genu *TRPS1* nalezený v rozličných stádiích rakoviny prsu naznačuje, že tento gen může hrát důležitou roli v proliferaci a/nebo přežívání rakovinných buněk či dokonce v apoptóze. Zatím ale není známo, zdali nadbytečná exprese proteinu TRPS1 ovlivňuje regulaci růstu rakovinných buněk.

Vývoj orgánů je velmi citlivý na správné dávky transkripčních faktorů; jejich limitované množství může zapříčinit pozměnění stechiometrie při formování multimerních proteinových komplexů a tím odchýlit vývoj orgánu od normy. Cílové geny esenciální pro kraniofaciální a skeletální vývoj, které jsou podřízené a závislé na regulaci prostřednictvím transkripčního faktoru TRPS1, mohou zůstat díky mutovanému TF TRPS1 nefunkční či s minimální hladinou exprese, což může vést k nesprávnému vývoji citlivých tělních struktur. I přes rozsáhlé poznatky o fungování genu *TRPS1* nevíme o tomto genu zdaleka vše; snad budoucí výzkumy v této oblasti pomohou ještě lépe porozumět kraniofaciálnímu vývoji i vývoji končetin.

9. Seznam použitých zkratek

aa amino acid
APC Adenomatous Polyposis Coli protein
AS Ambras syndrome
BMD bone mineral density
bp base pair
CGH Comparative genome hybridization
CSEs Cone-shaped epiphysis
EIF3S3 Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3
EXT1 Exostosin 1 gene
EXTL Exostosin like gene
FISH Fluorescence in situ hybridization
Gli3 GLI family zinc finger 3
Hdac Histone deacetylases
Hh Hedgehog
HME Hereditary multiple exostoses
HS heparan sulfate
IHh Indian Hedgehog
kb kilo base
LC8a dynein light chain 8 protein
LGCR Langer-Giedion syndrome chromosomal region
LOH loss of heterozygosity
MCPP metacarpophalangeal pattern profile
MLPA multiplex ligation-dependent probe amplification
MYC myelocytomatosis oncogene
NF1/NF2 Neurofibromin 1/Neurofibromin 2 protein
NLS nuclear localization signal
ORF open reading frame
PCR polymerase chain reaction
PTH Parathyroid hormone
PTHrP Parathyroid hormone-related protein
RNF4 RING Finger protein
RTG roentgen
SNP single nucleotide polymorphism
STAT3 signal transducer and activator of transcription 3
TF transcription factor
TFBS transcription factor binding site
TRPS trichorhinophalangeal syndrome
zf zinc-finger domain

10. Seznam použité literatury

Internetové zdroje:

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md), 2000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

The GeneCards Human Gene Database, GeneCards®. Crown Human Genome Center, Department of Molecular Genetics, the Weizmann Institute of Science with XENNEX a division of LifeMap sciences, 1996. Available at: <http://www.genecards.org/>

The Human Gene Mutation Database, HGMD®. Institute of Medical Genetics in Cardiff, Cardiff University, Great Britain, 2015. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>

MRC-Holland MLPA®. MRC-Holland b.v. company, Amsterdam, the Netherlands, 2014. Available at: www.mlpa.com

QIAGEN® Sample & Assay Technologies. QIAGEN® company, Hilden, Germany, 2014. Available at: www.qiagen.com

National Center for Biotechnology Information, NCBI. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA, 2015. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Basic Local Alignment Search Tool, BLAST®. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA, 2015. Available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Genetics Home References. A service of the U.S. National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, USA, 2014. Available at: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TRPS1>

Vědecké publikace:

Ackert-Bicknell CL, Demissie S, Tsaih SW, Beamer WG, Cupples LA, Paigen BJ, Hsu YH, Kiel DP, and Karasik D. 2012. Genetic variation in TRPS1 may regulate hip geometry as well as bone mineral density. *Bone* 50(5):1188-1195.

Ahn J, Josefludecke H, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, Horsthemke B, and Wells DE. 1995. CLONING OF THE PUTATIVE TUMOR-SUPPRESSOR GENE FOR HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSES (EXT1). *Nature Genetics* 11(2):137-143.

Alvarez CM, De Vera MA, Heslip TR, and Casey B. 2007. Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(462):73-79.

- Bellaiche Y, The I, and Perrimon N. 1998. Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394(6688):85-88.
- Bertorelli R, Capone L, Ambrosetti F, Garavelli L, Varriale L, Mazza V, Stanghellini I, Percesepe A, and Forabosco A. 2007. The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clinical Genetics* 72(5):490-491.
- Carey DJ. 1997. Syndecans: Multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochemical Journal* 327:1-16.
- Carrington PR, Chen H, and Altick JA. 1994. TRICHORHINOPHALANGEAL SYNDROME, TYPE-I. *Journal of the American Academy of Dermatology* 31(2):331-336.
- Chandley AC. 1991. ON THE PARENTAL ORIGIN OF DE NOVO MUTATION IN MAN. *Journal of Medical Genetics* 28(4):217-223.
- Chang GTG, Steenbeek M, Schippers E, Blok LJ, van Weerden WM, van Alewijk D, Eussen BHI, van Steenbrugge GJ, and Brinkmann AO. 2000. Characterization of a zinc-finger protein and its association with apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute* 92(17):1414-1421.
- Chang GTG, van den Bemd G, Jhamai M, and Brinkmann AO. 2002. Structure and function of GC79/TRPS1, a novel androgen-repressible apoptosis gene. *Apoptosis* 7(1):13-21.
- Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Roth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum WF, and Rappold G. 2009. Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *Journal of Medical Genetics* 46(12):834-839.
- Chen LH, Ning CC, and Chao SC. 2011. A novel nonsense mutation in the TRPS1 gene in a case of trichorhinophalangeal syndrome type I. *Dermatologica Sinica* 29(1):19-21.
- Colley KJ. 1997. Golgi localization of glycosyltransferases: More questions than answers. *Glycobiology* 7(1):1-13.
- Cook A, Raskind W, Blanton SH, Pauli RM, Gregg RG, Francomano CA, Puffenberger E, Conrad EU, Schmale G, Schellenberg G, Wijsman E, Hecht JT, Wells D, and Wagner MJ. 1993. GENETIC-HETEROGENEITY IN FAMILIES WITH HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSES. *American Journal of Human Genetics* 53(1):71-79.
- Corsini C, Gencik M, Willems M, Decker E, Sanchez E, Puechberty J, Schneider A, Girard M, Edery P, Bretonnes P, Cottalorda J, Lefort G, Jeandel C, Sarda P and Genevieve D. 2014. Somatic mosaicism in trichorhinophalangeal syndrome: a lesson for genetic counseling. *European Journal of Human Genetics* 22(1):136-139.
- Crippa M, Bestetti I, Perotti M, Castronovo C, Tabano S, Picinelli C, Grassi G, Larizza L, Pincelli AI, and Finelli P. 2014. New case of trichorhinophalangeal syndrome-like phenotype with a de novo t(2;8)(p16.1;q23.3) translocation which does not disrupt the TRPS1 gene. *Bmc Medical Genetics* 15:9.
- David D, Marques B, Ferreira C, Araujo C, Vieira L, Soares G, Dias C, and Pinto M. 2013. Co-segregation of trichorhinophalangeal syndrome with a t(8;13)(q23.3;q21.31) familial translocation that appears to increase TRPS1 gene expression. *Human Genetics* 132(11):1287-1299.
- Erickson RP. 2010. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: An update. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 705(2):96-106.
- Fantauzzo KA, Bazzi H, Jahoda CAB, and Christiano AM. 2008a. Dynamic expression of the zinc-finger transcription factor Trps1 during hair follicle morphogenesis and cycling. *Gene Expression Patterns* 8(2):51-57.
- Fantauzzo KA, and Christiano AM. 2012. Trps1 activates a network of secreted Wnt inhibitors and transcription factors crucial to vibrissa follicle morphogenesis. *Development* 139(1):203-214.
- Fantauzzo KA, Kurban M, Levy B, and Christiano AM. 2012. Trps1 and Its Target Gene Sox9 Regulate Epithelial Proliferation in the Developing Hair Follicle and Are Associated with Hypertrichosis. *Plos Genetics* 8(11):12.
- Fantauzzo KA, Tadin-Strapps M, You Y, Mentzer SE, Baumeister FAM, Cianfarani S, Van Maldergem L, Warburton D, Sundberg JP, and Christiano AM. 2008b. A position effect on TRPS1 is

- associated with Ambras syndrome in humans and the Koala phenotype in mice. *Human Molecular Genetics* 17(22):3539-3551.
- Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, and Kallioniemi OP. 1997. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends in Genetics* 13(10):405-409.
- Gai ZB, Gui T, and Muragaki Y. 2011. The function of TRPS1 in the development and differentiation of bone, kidney, and hair follicles. *Histology and Histopathology* 26(7):915-921.
- Georgopoulos K. 1997. Transcription factors required for lymphoid lineage commitment. *Current Opinion in Immunology* 9(2):222-227.
- Giedion A. 1966. DAS TRICHO-RHINO-PHALANGEALE SYNDROM. *Helvetica Paediatrica Acta* 21(5):475-&.
- Giedion A. 1998. Phalangeal cone-shaped epiphyses of the hand: their natural history, diagnostic sensitivity, and specificity in cartilage hair hypoplasia and the trichorhinophalangeal syndromes I and II. *Pediatric Radiology* 28(10):751-758.
- Giedion A, Burdea M, Fruchter Z, Meloni T, and Trosco V. 1973. AUTOSOMAL-DOMINANT TRANSMISSION OF TRICHO-RHINO-PHALANGEAL SYNDROME - REPORT OF 4 UNRELATED FAMILIES, REVIEW OF 60 CASES. *Helvetica Paediatrica Acta* 28(3):249-259.
- Grimm T, Meng G, Liechtigallati S, Bettecken T, Muller CR, and Muller B. 1994. ON THE ORIGIN OF DELETIONS AND POINT MUTATIONS IN DUCHENNE MUSCULAR-DYSTROPHY - MOST DELETIONS ARISE IN OOGENESIS AND MOST POINT MUTATIONS RESULT FROM EVENTS IN SPERMATOGENESIS. *Journal of Medical Genetics* 31(3):183-186.
- Hall BD, Langer LO, Giedion A, Smith DW, Cohen MM, Jr., Beals RK, and Brandner M. 1974. Langer-Giedion syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser* 10(12):147-164.
- Hecht JT, Hogue D, Strong LC, Hansen MF, Blanton SH, and Wagner M. 1995. HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSIS AND CHONDROSARCOMA - LINKAGE TO CHROMOSOME-11 AND LOSS OF HETEROZYGOSITY FOR EXT-LINKED MARKERS ON CHROMOSOME-11 AND CHROMOSOME-8. *American Journal of Human Genetics* 56(5):1125-1131.
- Hennekam RCM. 1991. HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSES. *Journal of Medical Genetics* 28(4):262-266.
- Herzig RP, Andersson U, and Scarpulla RC. 2000. Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and *Drosophila*. *Journal of Cell Science* 113(23):4263-4273.
- Hilton MJ, Gutierrez L, Zhang L, Moreno PA, Reddy M, Brown N, Tan Y, Hill A, and Wells DE. 2001. An integrated physical map of 8q22-q24: Use in positional cloning and deletion analysis of Langer-Giedion syndrome. *Genomics* 71(2):192-199.
- Hilton MJ, Sawyer JM, Gutierrez L, Hogart A, Kung TC, and Wells DE. 2002. Analysis of novel and recurrent mutations responsible for the tricho-rhino-phalangeal syndromes. *Journal of Human Genetics* 47(3):103-106.
- Hou J, Parrish J, Ludecke HJ, Sapru M, Wang Y, Chen W, Hill A, Siegelbartelt J, Northrup H, Elder FFB et al. . 1995. A 4-MEGABASE YAC CONTIG THAT SPANS THE LANGER-GIEDION SYNDROME REGION ON HUMAN-CHROMOSOME 8Q24.1 - USE IN REFINING THE LOCATION OF THE TRICHO-RHINO-PHALANGEAL SYNDROME AND MULTIPLE EXOSTOSES GENES (TRPS1 AND EXT1). *Genomics* 29(1):87-97.
- Ito T, Shimomura Y, Farooq M, Suzuki N, Sakabe JI, and Tokura Y. 2013. Trichorhinophalangeal syndrome with low expression of TRPS1 on epidermal and hair follicle epithelial cells. *Journal of Dermatology* 40(5):396-398.
- Jarrousse AS, Petit F, Kreutzer-Schmid C, Gaedigk R, and Schmid HP. 1999. Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay. *Journal of Biological Chemistry* 274(9):5925-5930.
- Jennes I, Entius MM, Van Hul E, Parra A, Sangiorgi L, and Wuyts W. 2008. Mutation screening of EXT1 and EXT2 by denaturing high-performance liquid chromatography, direct sequencing analysis, fluorescence in situ hybridization, and a new multiplex ligation-dependent probe

- amplification probe set in patients with multiple osteochondromas. *Journal of Molecular Diagnostics* 10(1):85-92.
- Jennes I, Zuntini M, Mees K, Palagani A, Pedrini E, De Cock G, Fransen E, Vanden Berghe W, Sangiorgi L, and Wuyts W. 2012. Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene* 492(1):148-159.
- Johnson VP, Altherr MR, Blake JM, and Keppen LD. 1994. FISH DETECTION OF WOLF-HIRSCHHORN SYNDROME - EXCLUSION OF D4F26 AS CRITICAL SITE. *American Journal of Medical Genetics* 52(1):70-74.
- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, and Tijian R. 1987. ISOLATION OF CDNA-ENCODING TRANSCRIPTION FACTOR SP1 AND FUNCTIONAL-ANALYSIS OF THE DNA-BINDING DOMAIN. *Cell* 51(6):1079-1090.
- Kaiser FJ, Brega P, Raff ML, Byers PH, Gallati S, Kay TT, de Almeida S, Horsthemke B, and Ludecke HJ. 2004. Novel missense mutations in the TRPS1 transcription factor define the nuclear localization signal. *European Journal of Human Genetics* 12(2):121-126.
- Kaiser FJ, Ludecke HJ, and Weger S. 2007. SUMOylation modulates transcriptional repression by TRPS1. *Biological Chemistry* 388(4):381-390.
- Kaiser FJ, Moroy T, Chang GTG, Horsthemke B, and Ludecke HJ. 2003a. The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry* 278(40):38780-38785.
- Kaiser FJ, Tavassoli K, Van den Bemd GJ, Chang GTG, Horsthemke B, Moroy T, and Ludecke HJ. 2003b. Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor suppresses the transcriptional repression activity of TRPS1. *Human Molecular Genetics* 12(11):1349-1358.
- Kajii T, Gonzalez IF, and Matsuura S. 1994. TRICHORHINOPHALANGEAL SYNDROME TYPE-III. *American Journal of Medical Genetics* 49(3):349-350.
- Kleinjan DJ, and van Heyningen V. 1998. Position effect in human genetic disease. *Human Molecular Genetics* 7(10):1611-1618.
- Knudson AG. 1971. MUTATION AND CANCER - STATISTICAL STUDY OF RETINOBLASTOMA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(4):820-&.
- Kobayashi H, Hino M, Shimodahira M, Iwakura T, Ishihara T, Ikekubo K, Ogawa Y, Nakao K, and Kurahachi H. 2002. Missense mutation of TRPS1 in a family of tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. *American Journal of Medical Genetics* 107(1):26-29.
- Kobayashi S, Morimoto K, Shimizu T, Takahashi M, Kurosawa H, and Shirasawa T. 2000. Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268(3):860-867.
- Kunath M, Ludecke HJ, and Vortkamp A. 2002. Expression of Trps1 during mouse embryonic development. *Mechanisms of Development* 119:S117-S120.
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, and Prydz H. 1992. CPG ISLANDS AS GENE MARKERS IN THE HUMAN GENOME. *Genomics* 13(4):1095-1107.
- Lemerrer M, Legeaimallet L, Jeannin PM, Horsthemke B, Schinzel A, Plauchu H, Toutain A, Achard F, Munnich A, and Maroteaux P. 1994. A GENE FOR HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSES MAPS TO CHROMOSOME 19P. *Human Molecular Genetics* 3(5):717-722.
- Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U, and Lidholt K. 1998. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 273(41):26265-26268.
- Ludecke HJ, Ahn J, Lin X, Hill A, Wagner MJ, Schomburg L, Horsthemke B, and Wells DE. 1997. Genomic organization and promoter structure of the human EXT1 gene. *Genomics* 40(2):351-354.
- Ludecke HJ, Johnson C, Wagner MJ, Wells DE, Turleau C, Tommerup N, Latosbielenska A, Sandig KR, Meinecke P, Zabel B and Horsthemke B. 1991. MOLECULAR DEFINITION OF THE SHORTEST

- REGION OF DELETION OVERLAP IN THE LANGER-GIEDION SYNDROME. *American Journal of Human Genetics* 49(6):1197-1206.
- Ludecke HJ, Schaper J, Meinecke P, Momeni P, Gross S, von Holtum D, Hirche H, Abramowicz MJ, Albrecht B, Apacik C, Christen HJ, Claussen U, Devriendt K, Fastnacht E, Forderer A, Friedrich U, Goodship TH, Greiwe M, Hamm H, Hennekam RC, Hinkel GK, Hoeltzenbein M, Kayserili H, Majewski F, Mathieu M, McLeod R, Midro AT, Moog U, Nagai T, Niikawa N, Orstavik KH, Plöchl E, Seitz C, Schmidtke J, Tranebjaerg L, Tsukahara M, Wittwer B, Zabel B, Gillissen-Kaesbach G and Horsthemke B. 2001. Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *American Journal of Human Genetics* 68(1):81-91.
- Ludecke HJ, Schmidt O, Nardmann J, von Holtum D, Meinecke P, Muenke M, and Horsthemke B. 1999. Genes and chromosomal breakpoints in the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8. *Human Genetics* 105(6):619-628.
- Ludecke HJ, Wagner MJ, Nardmann J, Lapillo B, Parrish JE, Willems PJ, Haan EA, Frydman M, Hamers GJH, Wells DE and Horsthemke D. 1995. MOLECULAR DISSECTION OF A CONTIGUOUS GENE SYNDROME - LOCALIZATION OF THE GENES INVOLVED IN THE LANGER-GIEDION SYNDROME. *Human Molecular Genetics* 4(1):31-36.
- Maas SM, Shaw AC, Bikker H, Ludecke HJ, van der Tuin K, Badura-Stronka M, Belligni E, Bonati MT, Carvalho DR, Cobben J, de Man SA, Den Hollander NS, Di Donato N, Garavelli L, Grønborg S, Herkert JC, Hoozeboom AJ, Jamsheer A, Latos-Bielenska A, Maat-Kievit A, Magnani C, Marcelis C, Mathijssen IB, Nielsen M, Otten E, Ousager LB, Pilch J, Plomp A, Poke G, Poluha A, Posmyk R, Rieubland C, Silengo M, Simon M, Steichen E, Stumpel C, Szakszon K, Polonkai E, van den Ende J, van der Steen A, van Essen T, van Haeringen A, van Hagen JM, Verheij JB, Mannens MM and Hennekam RC. 2015. Phenotype and genotype in 103 patients with tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Eur J Med Genet*.
- Machuca G, Martinez F, Machuca C, and Bullon P. 1997. Craniofacial and oral manifestations of trichorhinophalangeal syndrome type I (Giedion's syndrome) - A case report. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 84(1):35-39.
- Malik TH, Shoichet SA, Latham P, Kroll TG, Peters LL, and Shivdasani RA. 2001. Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1. *Embo Journal* 20(7):1715-1725.
- Malik TH, von Stechow D, Bronson RT, and Shivdasani RA. 2002. Deletion of the GATA domain of TRPS1 causes an absence of facial hair and provides new insights into the bone disorder in inherited tricho-rhino-phalangeal syndromes. *Molecular and Cellular Biology* 22(24):8592-8600.
- McBrien J, Crolla JA, Huang SW, Kelleher J, Gleeson J, and Lynch SA. 2008. Further case of microdeletion of 8q24 with phenotype overlapping Langer-Giedion without TRPS1 deletion. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A(12):1587-1592.
- McCormick C, Duncan G, Goutsos KT, and Tufaro F. 2000. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(2):668-673.
- McCormick C, Leduc Y, Martindale D, Mattison K, Esford LE, Dyer AP, and Tufaro F. 1998. The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nature Genetics* 19(2):158-161.
- Michalek P, Doherty JT, and Vesela MM. 2009. Anesthetic management of a child with Langer-Giedion (TRPS II) syndrome. *Journal of Anesthesia* 23(3):456-459.
- Moilanen AM, Poukka H, Karvonen U, Hakli M, Janne OA, and Palvimo JJ. 1998. Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Molecular and Cellular Biology* 18(9):5128-5139.
- Momeni P, Glockner G, Schmidt O, von Holtum D, Albrecht B, Gillissen-Kaesbach G, Hennekam R, Meinecke P, Zabel B, Rosenthal A, Horsthemke B, Lüdecke HJ. 2000. Mutations in a new

- gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nature Genetics* 24(1):71-74.
- Morioka D. 1999. Langer-Giedion syndrome associated with submucous cleft palate. *Plastic and Reconstructive Surgery* 104(7):2329-2329.
- Muller-Rover S, Rossiter H, Lindner G, Peters EMJ, Kupper TS, and Paus R. 1999. Hair follicle apoptosis and Bcl-2. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 4(3):272-277.
- Nan X, Dai S, Li CT, Chen XR, Zhao HS, Zhang FS, and Song QH. 2013. Novel deletion mutation of TRPS1 gene in a Chinese patient of trichorhinophalangeal syndrome type I. *Gene* 523(1):88-91.
- Napierala D, Maciejewska I, Munivez E, Dawson B, D'Souza R, and Lee B. 2009. Role of the Trps1 transcription factor in odontoblasts differentiation and function. *Developmental Biology* 331(2):436-437.
- Napierala D, Sam K, Zheng Q, Zhou G, Shivdasani RA, and Lee B. 2005. The role of the Trps1 transcriptional repressor in endochondral bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 20(9):S9-S9.
- Nardmann J, Tranebjaerg L, Horsthemke B, and Ludecke HJ. 1997. The tricho-rhino-phalangeal syndromes: Frequency and parental origin of 8q deletions. *Human Genetics* 99(5):638-643.
- Naritomi K, and Hirayama K. 1989. PARTIAL TRISOMY OF DISTAL-8Q DERIVED FROM MOTHER WITH MOSAIC 8Q23.3- 24.13 DELETION, AND RELATIVELY MILD EXPRESSION OF TRICHORHINOPHALANGEAL SYNDROME-I. *Human Genetics* 82(2):199-201.
- Naselli A, Vignolo M, Di Battista E, Papale V, Aicardi G, Becchetti S, and Toma P. 1998. Trichorhinophalangeal syndrome type I in monozygotic twins discordant for hip pathology. Report on the morphological evolution of cone-shaped epiphyses and the unusual pattern of skeletal maturation. *Pediatric Radiology* 28(11):851-855.
- Niikawa N, and Kamei T. 1986. THE SUGIO-KAJII SYNDROME, PROPOSED TRICHORHINOPHALANGEAL SYNDROME TYPE-III. *American Journal of Medical Genetics* 24(4):759-760.
- Ning CC, Hsu MML, Lee JYY, and Chao SC. 2001. Clinical characteristics of tricho-rhino-phalangeal syndrome type I in Taiwanese. *Journal of the Formosan Medical Association* 100(9):635-638.
- Nishioka K, Itoh S, Suemoto H, Kanno S, Gai Z, Kawakatsu M, Tanishima H, Morimoto Y, Hatamura I, Yoshida M and Muragaki Y. 2008. Trps1 deficiency enlarges the proliferative zone of growth plate cartilage by upregulation of Pthrp. *Bone* 43(1):64-71.
- Pannier S, and Legeai-Mallet L. 2008. Hereditary multiple exostoses and enchondromatosis. *Best Practice & Research in Clinical Rheumatology* 22(1):45-54.
- Pereza N, Severinski S, Ostojic S, Volk M, Maver A, Dekanic KB, Kapovic M, and Peterlin B. 2012. Third case of 8q23.3-q24.13 deletion in a patient with Langer-Giedion syndrome phenotype without TRPS1 gene deletion. *American Journal of Medical Genetics Part A* 158A(3):659-663.
- Piscopo DM, Johansen EB, and Derynck R. 2009. Identification of the GATA Factor TRPS1 as a Repressor of the Osteocalcin Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 284(46):31690-31703.
- Porter DE, Lonie L, Fraser M, Dobson-Stone C, Porter JR, Monaco AP, and Simpson A. 2004. Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses - A genotype-phenotype study. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 86B(7):1041-1046.
- Poznanski AK, and Gartman S. 1997. A bibliography covering the use of metacarpophalangeal pattern profile analysis in bone dysplasias, congenital malformation syndromes, and other disorders. *Pediatric Radiology* 27(5):358-365.
- Radvanyi L, Singh-Sandhu D, Gallichan S, Lovitt C, Pedyczak A, Mallo G, Gish K, Kwok K, Hanna W, Zubovits J, Armes J, Venter D, Hakimi J, Shortreed J, Donovan M, Parrington M, Dunn P, Oomen R, Tartaglia J, and Berinstein NL. 2005. The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(31):11005-11010.
- Ramos FJ, McDonaldmgin DM, Emanuel BS, and Zackai EH. 1992. TRICHORHINOPHALANGEAL SYNDROME TYPE-II (LANGER-GIEDION) WITH PERSISTENT CLOACA AND PRUNE BELLY

- SEQUENCE IN A GIRL WITH 8Q INTERSTITIAL DELETION. *American Journal of Medical Genetics* 44(6):790-794.
- Raskind WH, Conrad EU, Chansky H, and Matsushita M. 1995. LOSS OF HETEROZYGOSITY IN CHONDROSARCOMAS FOR MARKERS LINKED TO HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSES LOCI ON CHROMOSOME-8 AND CHROMOSOME-11. *American Journal of Human Genetics* 56(5):1132-1139.
- Riedl S, Giedion A, Schweitzer K, Mullner-Eidenbock AM, Grill F, Frisch H, and Ludecke HJ. 2004. Pronounced short stature in a girl with Tricho-Rhino-Phalangeal syndrome II (TRPS II, Langer-Giedion syndrome) and growth hormone deficiency. *American Journal of Medical Genetics Part A* 131A(2):200-203.
- Rooms L, Reyniers E, and Kooy RF. 2005. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: A comparison of detection methods. *Human Mutation* 25(6):513-524.
- Sasaki T, Tonoki H, Soejima H, and Niikawa N. 1997. A 4 Mb cryptic deletion associated with inv(8)(q13.1q24.11) in a patient with trichorhinophalangeal syndrome type I. *Journal of Medical Genetics* 34(4):335-339.
- Schmale GA, Conrad EU, and Raskind WH. 1994. THE NATURAL-HISTORY OF HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSES. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 76A(7):986-992.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, and Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 30(12):13.
- Schwartz CE, Johnson JP, Holycross B, Mandeville TM, Sears TS, Graul EA, Carey JC, Schroer RJ, Phelan MC, Szollar J, Flannery DB, and Stevenson RE. 1988. DETECTION OF SUBMICROSCOPIC DELETIONS IN BAND 17P13 IN PATIENTS WITH THE MILLER-DIEKER SYNDROME. *American Journal of Human Genetics* 43(5):597-604.
- Sendi-Naderi A, Ludecke HJ, Unger S, Kern JS, Wolff G, Bruckner-Tuderman L, and Nashan D. 2010. A familial case of tricho-rhino-phalangeal syndrome type III with a novel missense mutation in exon 6 of the TRPS1 gene. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 24(5):612-614.
- Shanske AL, Patel A, Saukam S, Levy B, and Ludecke HJ. 2008. Clinical and Molecular Characterization of a Patient With Langer-Giedion Syndrome and Mosaic del(8)(q22.3q24.13). *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A(24):3211-3216.
- Signori E, Massi E, Matera MG, Poscente M, Gravina C, Falcone G, Rosa MA, Rinaldi M, Wuyts W, Seripa D, Dallapiccola B, and Fazio VM. 2007. A combined analytical approach reveals novel EXT1/2 gene mutations in a large cohort of Italian multiple osteochondromas patients. *Genes Chromosomes & Cancer* 46(5):470-477.
- Solomon L. 1963. HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSIS. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 45(2):292-304.
- Solomon L. 1964. HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSIS. *American Journal of Human Genetics* 16(3):351-&.
- Stickens D, Clines G, Burbee D, Ramos P, Thomas S, Hogue D, Hecht JT, Lovett M, and Evans GA. 1996. The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nature Genetics* 14(1):25-32.
- Suemoto H, Muragaki Y, Nishioka K, Sato M, Ooshima A, Itoh S, Hatamura I, Ozaki M, Braun A, Gustafsson E and Fässler R. 2007. Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Developmental Biology* 312(2):572-581.
- Sun L, Liu AP, and Georgopoulos K. 1996. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo Journal* 15(19):5358-5369.
- Tsang WK, Yang KWM, and Fong CM. 2014. Langer-Giedion syndrome: the evolving imaging features in hands and beyond. *Skeletal Radiology* 43(2):251-255.
- Turleau C, Chavincolin F, Degrouchy J, Maroteaux P, and Rivera H. 1982. LANGER-GIEDION SYNDROME WITH AND WITHOUT DEL 8Q - ASSIGNMENT OF CRITICAL SEGMENT TO 8Q23. *Human Genetics* 62(3):183-187.

- Vaccaro M, Guarneri C, and Blandino A. 2005. Trichorhinophalangeal syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53(5):858-860.
- van den Bemd G, Jhamai M, Brinkmann AO, and Chang GTG. 2003. The atypical GATA protein TRPS1 represses androgen-induced prostate-specific antigen expression in LNCaP prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312(3):578-584.
- Vantrappen G, Feenstra L, and Frijns JP. 1997. Conductive hearing loss in the tricho-rhino-phalangeal syndrome (TRP II) or in the Langer-Giedion syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 72(3):372-373.
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, and Tabin CJ. 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273(5275):613-622.
- Waaiker CJF, Winter MGT, Reijnders CMA, de Jong D, Ham SJ, Bovee J, and Szuhai K. 2013. Intronic deletion and duplication proximal of the EXT1 gene: A novel causative mechanism for multiple osteochondromas. *Genes Chromosomes & Cancer* 52(4):431-436.
- Wang LS, Lu WL, Zhang L, Huang Y, Scheib R, Liu XY, Myers L, Lu L, Farber CR, Liu GF, Wang CY, Deng H, Williams RW, Wang Y, Gu W and Jiao Y. 2014. Trps1 Differentially Modulates the Bone Mineral Density between Male and Female Mice and Its Polymorphism Associates with BMD Differently between Women and Men. *Plos One* 9(1):8.
- Wicklund CL, Pauli RM, Johnston D, and Hecht JT. 1995. NATURAL-HISTORY STUDY OF HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSES. *American Journal of Medical Genetics* 55(1):43-46.
- Wu YQ, Heutink P, Devries BBA, Sandkuijl LA, Vandenouweland AMW, Niermeijer MF, Galjaard H, Reyniers E, Willems PJ, and Halley DJJ. 1994. ASSIGNMENT OF A 2ND LOCUS FOR MULTIPLE EXOSTOSES TO THE PERICENTROMERIC REGION OF CHROMOSOME-11. *Human Molecular Genetics* 3(1):167-171.
- Wuelling M, Pasdziernik M, Moll CN, Thiesen AM, Schneider S, Johannes C, and Vortkamp A. 2013. The multi zinc-finger protein Trps1 acts as a regulator of histone deacetylation during mitosis. *Cell Cycle* 12(14):2219-2232.
- Wuyts W, Roland D, Ludecke HJ, Wauters J, Foulon M, Van Hul W, and Van Maldergem L. 2002. Multiple exostoses, mental retardation, hypertrichosis, and brain abnormalities in a boy with a de novo 8q24 submicroscopic interstitial deletion. *American Journal of Medical Genetics* 113(4):326-332.
- Wuyts W, and Van Hul W. 2000. Molecular basis of multiple exostoses: Mutations in the EXT1 and EXT2 genes. *Human Mutation* 15(3):220-227.
- Wuyts W, Van Hul W, De Boule K, Hendrickx J, Bakker E, Vanhoenacker F, Mollica F, Ludecke HJ, Sayli BS, Pazzaglia UE, Mortier G, Hamel B, Conrad EU, Matsushita M, Raskind WH, and Willems PJ. 1998. Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *American Journal of Human Genetics* 62(2):346-354.
- Wuyts W, VanHul W, Wauters J, Nemtsova M, Reyniers E, VanHul E, DeBoule K, deVries BBA, Hendrickx J, Herrygers I, Bossuyt P, Balemans W, Franssen E, Vits L, Coucke P, Nowak NJ, Shows TB, Mallet L, van den Ouweland AM, McGaughran J, Halley DJ, and Willems PJ. 1996. Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses. *Human Molecular Genetics* 5(10):1547-1557.
- Xu L, Xia JH, Jiang HJ, Zhou JN, Li HJ, Wang DP, Pan Q, Long ZG, Fan CH, and Deng HX. 1999. Mutation analysis of hereditary multiple exostoses in the Chinese. *Human Genetics* 105(1-2):45-50.
- Yamamoto Y, Oguro N, Miyao M, Yanagisawa M, and Ohsawa T. 1988. PROMETAPHASE CHROMOSOMES IN TRICHO-RHINO-PHALANGEAL SYNDROME (TRPS) TYPE-1. *Teratology* 38(5):526-526.
- Zlotogora J. 1998. Germ line mosaicism. *Human Genetics* 102(4):381-386.